

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
5 juillet 2001 (05.07.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/47528 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: A61K 31/70

(74) Mandataires: GROSSET-FOURNIER, Chantal etc.;
Grosset-Fournier & Demachy S.A.R.L., 20, rue de
Maubeuge, F-75009 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/03600

(22) Date de dépôt international:

20 décembre 2000 (20.12.2000)

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Langue de dépôt:

français

(26) Langue de publication:

français

(30) Données relatives à la priorité:

99/16409 23 décembre 1999 (23.12.1999) FR

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

Publiée:

— *Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): AGHA-JARI, Nushin, Banu, Hélène [DK/FR]; 32, cours Franklin Roosevelt, F-69006 Lyon (FR). ROBERT, Xavier, Guy [FR/FR]; 123, rue André Bollier, F-69007 Lyon (FR). HASER, Richard, Michel [FR/FR]; 32, cours Franklin Roosevelt, F-69006 Lyon (FR).



A2 (54) Title: NOVEL GLYCOSIDASE INHIBITORS AND THEIR PHARMACOLOGICAL USES, IN PARTICULAR FOR TREATING DIABETES

WO 01/47528 (54) Titre: NOUVEAUX INHIBITEURS DE GLYCOSIDASES ET LEURS APPLICATIONS PHARMACOLOGIQUES, NOTAMMENT POUR TRAITER LE DIABÈTE

(57) Abstract: The invention concerns the use of a polyamine derivative or a polyamine for inhibiting the active site of glycosidase enzymes intervening in the transformation of polysaccharides into sugars, in particular into glucose, in a living organism.

WO 01/47528 (57) Abrégé: L'invention a pour objet l'utilisation d'un dérivé de polyamine ou d'une polyamine pour inhiber le site actif des enzymes glycosidases intervenant dans la transformation de polysaccharides en sucres, notamment en glucose, dans un organisme vivant.

NOUVEAUX INHIBITEURS DE GLYCOSIDASES ET LEURS APPLICATIONS PHARMACOLOGIQUES, NOTAMMENT POUR TRAITER LE DIABÈTE.

5

L'invention a pour objet de nouveaux inhibiteurs de glycosidases et leurs applications pharmacologiques, notamment pour traiter le diabète.

Parmi les glycosyl hydrolases, certaines sont responsables de la dégradation ou de la digestion des sucres. Certaines de ces enzymes, comme les α -amylases, sont très importantes au plan biotechnologique (bio-industries des détergents, des dérivés et des transformations de l'amidon...), mais aussi comme cibles de molécules d'intérêt pharmacologique, par exemple pour le traitement du diabète.

Plus précisément, les amylases sont des enzymes hydrolytiques qui sont largement répandues dans la nature ; on les trouve notamment dans les animaux, les microbes, les plantes et les champignons. Ces enzymes sont impliquées dans la dégradation en oligosaccharides de sucres, tels que l'amidon et le glycogène, par hydrolyse des liaisons α -1,4 interglycosidiques (pour les α -amylases). Les grains d'orge contiennent deux isoenzymes principales d' α -amylase, AMY1 et AMY2, qui sont toutes les deux impliquées dans la dégradation de l'amidon pour fournir de l'énergie au développement de l'embryon de la plante.

Par ailleurs, des études ont porté sur la résolution des structures 3D de l'isoenzyme 2 (AMY2) des grains d'orge (Crystal and molecular structure of barley α -amylase, Kadziola et al., *J. Mol. Biol.* (1994) 239, 104-121 ; Molecular Structure of a barley α -amylase inhibitor complex : implications for starch binding and catalysis - Kadziola et al. *J. Mol. Biol.* (1998) 278, 205-217). La fonction de ces isoenzymes est de catalyser la transformation de polysaccharides (amidon, sucres divers...) à divers stades de la germination, en vue de la production de sucres assimilables par la plante pour ses besoins physiologiques et énergétiques. Les recherches ont permis d'établir l'architecture détaillée de ces protéines, ainsi que la topologie précise des sites actifs où se déroulent les réactions catalysées par ces enzymes. Un des objectifs majeurs est de mieux comprendre les remarquables différences de propriétés physico-chimiques de ces deux isoenzymes, et cela malgré leur très forte homologie de séquence (près de 80% d'identité).

Devant "l'irrésistible ascension planétaire du diabète" (bientôt 300 millions de diabétiques, *Le Monde*, 19 avril 1999), il paraît important et urgent de continuer de développer les voies de recherches dans ce domaine. Parmi celles-ci, la caractérisation, la mise au point de nouveaux inhibiteurs d'intérêt thérapeutique pour bloquer l'action de glycosidases, constituent l'une des approches importantes du problème.

Les inhibiteurs de type acarbose (de nature polysaccharidique) ont fait leur preuve, notamment dans le traitement du diabète non-insulino dépendant. Ils sont disponibles sur le marché, désormais dans beaucoup de pays. Comme tout médicament, ces molécules ne sont pas dénuées de tout effet secondaire, d'où l'intérêt 10 d'explorer d'autres voies.

Le rôle connu de la spermidine (et d'autres polyamines voisines) est son activité essentielle dans la prolifération, la croissance et la différentiation cellulaire. Il est bien établi que les polyamines interagissent avec l'ADN. Certaines protéines, comme le 15 récepteur de l'insuline, la protéine-kinase CK2, le récepteur N-méthyl-D-asparate, possèdent un site spécifique de reconnaissance de polyamine ayant probablement une fonction de régulation.

A ce jour, il n'existe que 2 exemples de complexes protéine-spermidine pour lesquels les structures 3D ont été déterminées et les coordonnées atomiques déposées.

Il s'agit de :

- une aminoglycoside 3-N-acetyltransferase de *Serratia marcescens* – dont la structure a été résolue par diffraction de rayons X (déposée dans la Protein DataBank sous le code 1B04). (Wolf, E. et al., Crystal Structure of a Gcn5-Related, N-acetyltransferase : *Serratia marcescens* aminoglycoside 3-N-acetyltransferase. *Cell* 25 (1998), (94)4, 439-449) ;

- une spermidine / putrescine – dont la structure a été résolue par diffraction de rayons X (déposée dans la Protein DataBank sous le code 1POT et 1POY) (Sugiyama S et al. The 1.8-A X-ray structure of the *Escherichia coli* PotD protein complexed with spermidine and the mechanism of polyamine binding. *Protein Sci.* (1996), 5(10), 1984-1990 ; Sugiyama S et al., Crystal structure of PotD, the primary receptor of the polyamine transport system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* (1996), 271(16), 9519-9525).

L'un des aspects de l'invention est de proposer une nouvelle classe d'inhibiteurs de glycosidases, et notamment d' α -amylases dépourvus des effets secondaires des inhibiteurs connus à ce jour, et non toxiques.

5 Un autre aspect de l'invention est de proposer de nouveaux inhibiteurs de glycosidases dont le coût de production est inférieur à celui requis pour préparer les inhibiteurs connus à ce jour.

10 Ces différents aspects sont atteints par l'invention, qui dans sa généralité concerne l'utilisation d'une molécule de type polyamine, d'un dérivé de polyamine ou d'une polyamine pour inhiber le site actif des glycosidases intervenant dans la transformation de polysaccharides en sucres, notamment en glucose, dans un organisme vivant.

Par "molécule de type polyamine", on désigne toute molécule appartenant à la super-famille chimique des polyamines, qui sont des molécules contenant au moins deux fonctions amines.

15 Par "dérivé de polyamine", on désigne toute molécule appartenant à la super-famille chimique des polyamines, mais contenant des modifications chimiques et/ou des fonctions chimiques greffées n'appartenant pas à la super-famille chimique des polyamines.

20 L'invention concerne également l'utilisation d'une molécule de type polyamine, d'un dérivé de polyamine ou d'une polyamine pour inhiber *in vitro* le site actif des glycosidases intervenant dans la transformation de polysaccharides en sucres, notamment en glucose, dans un organisme vivant.

25 L'invention concerne la mise en évidence d'une nouvelle classe d'inhibiteurs d' α -glycosidase, de type polyamine, donc de nature chimique radicalement différente des inhibiteurs utilisés actuellement en pharmacologie pour le traitement du diabète et également intéressants pour le traitement d'autres désordres métaboliques, comme l'obésité. Le représentant de cette nouvelle classe d'agents est une polyamine naturelle, la spermidine : $\text{NH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_4\text{-NH-}(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$.

30 On a en effet trouvé de façon inattendue que les polyamines possèdent une activité d'inhibition sur les glycosidases, en raison de leur affinité vis à vis de la cible enzymatique que constituent les glycosidases, notamment les α -amylases.

On a en effet montré l'existence d'une interaction spécifique entre une polyamine de type spermidine et une glycosidase, par exemple l'isoenzyme 1 de l' α -amylase d'orge (AMY 1).

Il a même été observé dans le cadre de l'invention qu'en présence des deux types d'inhibiteurs (spermidine et acarbose), l'inhibiteur de type polyamine est reconnu de manière préférentielle par la cible enzymatique, démontrant qu'il possède une affinité significativement supérieure pour l'enzyme par rapport aux inhibiteurs de type acarbose (de nature polysaccharidique) actuellement sur le marché.

Par organisme vivant on désigne aussi bien l'homme, que les animaux ou les végétaux.

L'activité d'inhibition mentionnée ci-dessus s'exerce aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, et met en jeu une enzyme de type α -amylase, donc appartenant à la famille des α -glycosidases présentes et opérationnelles dans tous les organismes vivants.

C'est la raison pour laquelle l'invention concerne l'utilisation d'un dérivé de polyamine ou d'une polyamine pour la préparation d'un médicament destiné au diagnostic, à la prévention ou au traitement de pathologies impliquant des désordres métaboliques liés aux glycosidases, et plus particulièrement une dérégulation de l'absorption intestinale de glucose, telles que le diabète non-insulino dépendant, l'obésité, l'hyperglycémie, ou l'hyperlipidémie.

L'utilisation de molécules de type polyamine pour inhiber les α glycosidases de façon compétitive par rapport à des substrats naturels présents chez le patients à traiter, en ralentissant l'absorption des sucres, est un nouveau concept thérapeutique selon l'invention.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation de polyamines, lesquelles comprennent au moins 2 charges positives, notamment au moins 3 fonctions amines, et le cas échéant au moins 1 fonction osidique (ou saccharidique) linéaire ou ramifiée, lesdites charges positives, notamment lesdites fonctions amines étant espacées par des chaînes carbonées dont la longueur est d'environ 2 atomes de carbone à environ 8 atomes de carbone, notamment d'environ 3 atomes de carbone à environ 5 atomes de carbone.

Pour fixer les idées, la distance entre deux charges positives adjacentes, notamment entre deux fonctions amines, est d'environ 4 Å à environ 7 Å.

En effet, en ce qui concerne la spermidine (voir Figure 1), on peut noter que la distance entre les charges positives portées par deux fonctions amine adjacentes le long de la chaîne est d'environ 5 Å pour N6-N10 et d'environ 6,5 Å pour N1-N6.

L'ensemble forme avantageusement une chaîne linéaire ou ramifiée de 7 à 19 atomes de carbone, et de préférence de 9 à 15 atomes de carbone.

L'invention concerne également un complexe entre une polyamine et une enzyme glycosidase, notamment glycosyl hydrolase et plus particulièrement α -amylase, présente dans tous les organismes vivants et responsable des réactions de transformation et d'hydrolyse d'oligosaccharides et de polysaccharides en molécules osidiques plus simples comme le maltose et le glucose, dans lequel la polyamine est fixée au niveau du site actif de l'enzyme, notamment par des liaisons hydrogène mettant en jeu les charges positives de la polyamine, correspondant à ses fonctions amines, et les fonctions carboxyliques de chaînes latérales d'acides aminés de la susdite enzyme, le nombre de liaisons hydrogène étant avantageusement d'au moins 4.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un complexe cristallin entre une polyamine et une enzyme glycosidase.

Par "site actif de l'enzyme", on désigne la région spécifique de l'enzyme impliquée dans la fixation d'une unité de type glucose appartenant à l'oligosaccharide ou polysaccharide fixé par l'enzyme. Par exemple, un tétrasaccharide se liant à l'enzyme dans le site actif occupera quatre sous-sites.

Selon un mode de réalisation avantageux, dans le complexe de l'invention, au moins deux des sous-sites du site actif de l'enzyme sont impliqués dans la liaison avec la susdite polyamine.

Par "sous-site du site actif de l'enzyme", on désigne un découpage du site actif de l'enzyme correspondant dans des conditions physiologiques à la fixation d'une seule unité osidique d'un polysaccharide.

Selon un autre mode de réalisation, lorsque dans le complexe de l'invention, l'enzyme glycosidase est l' α -amylase, notamment l' α -amylase d'orge (AMY 1), les quatre acides aminés suivants de l'enzyme : Glu (205), Trp (207), Asn (209), Asp (180) sont impliqués dans la liaison avec la polyamine.

Le complexe de l'invention, notamment entre l' α -amylase et la spermidine, peut être caractérisé par l'une au moins des interactions suivantes et notamment par

l'ensemble des interactions suivantes, qui sont des liaisons de type hydrogène et qui peuvent être définies comme indiqué ci-après :

Atomes de la Spermidine : Résidus d'AMY1 ou eau : Distance (Å) :

5

Numéro de l'atome d'azote

	N1	W207 Nε1	3.7
	N1	N209 Oδ1	3.4
10	N1	Wat 1250	3.1
	N6	E205 Oε2	3.7
	N10	D180 Oδ1	2.7
	N10	D180 Oδ2	3.7
	N10	Wat 1087	2.8
15	N10	Wat 1102	2.9
	N10	Wat 1259	2.8

20 Dans la colonne résidu d'AMY 1 ou eau, on a indiqué la position de l'acide aminé (code à 1 lettre) dans l'enzyme, ainsi que la position de l'atome d'azote ou d'oxygène dans la chaîne latérale de l'acide aminé.

"Wat" est une abréviation correspondant à une molécule d'eau, dans l'environnement de l'enzyme, et est référencée par un numéro arbitraire (voir Figure 1).

Le complexe de l'invention, notamment entre l'α-amylase et la spermidine peut être caractérisé par les interactions supplémentaires suivantes :

25

Interactions supplémentaires (de deuxième niveau) : Distances (Å) :

	Wat 1250 <=> W207 Nε1	3.6
	Wat 1250 <=> Wat 1637	3.2
	Wat 1087 <=> D180 Oδ1	3.8
	Wat 1087 <=> D180 Oδ2	3.3
30	Wat 1087 <=> Y52 O	3.7
	Wat 1087 <=> H93 Nε2	3.7
	Wat 1102 <=> D291 Oδ1	3.5
	Wat 1102 <=> D291 Oδ2	3.8
	Wat 1102 <=> H290 Nε2	3.5
35	Wat 1102 <=> Wat 1259	2.4
	Wat 1259 <=> D180 Oδ1	3.2
	Wat 1259 <=> D291 Oδ1	3.8
	Wat 1259 <=> D291 Oδ2	2.8
	Wat 1259 <=> H290 Nε2	3.1
40	Wat 1259 <=> R178 Nη2	3.3

Par interaction de deuxième niveau, on désigne par exemple des interactions plus faibles que les liaisons hydrogène, par exemple les interactions de Van der Waals ainsi que les liaisons hydrogène ne participant pas directement à des interactions avec la polyamine.

5 Selon un autre mode de réalisation, dans le complexe de l'invention, la polyamine est une chaîne d'environ 6 à environ 20 atomes, notamment comportant d'environ 6 à 15, et avantageusement d'environ 6 à 10 atomes d'azote, avantageusement deux fonctions amines primaires, respectivement à chacune des extrémités de la polyamine, l'une au moins des fonctions amines étant éventuellement substituée par un substituant choisi parmi, les polysaccharides linéaires ou cycliques possédant, d'environ 1 à environ 6 unités osidiques avantageusement le glucose, le maltose, ou la cyclodextrine, et l'un au moins des atomes d'azote à l'intérieur de la chaîne étant éventuellement substitué par un substituant choisi parmi les oligosaccharides, linéaires ou cycliques, de 1 à 6, notamment 1 à 3 unités osidiques, notamment le glucose, le maltose ou la cyclodextrine.

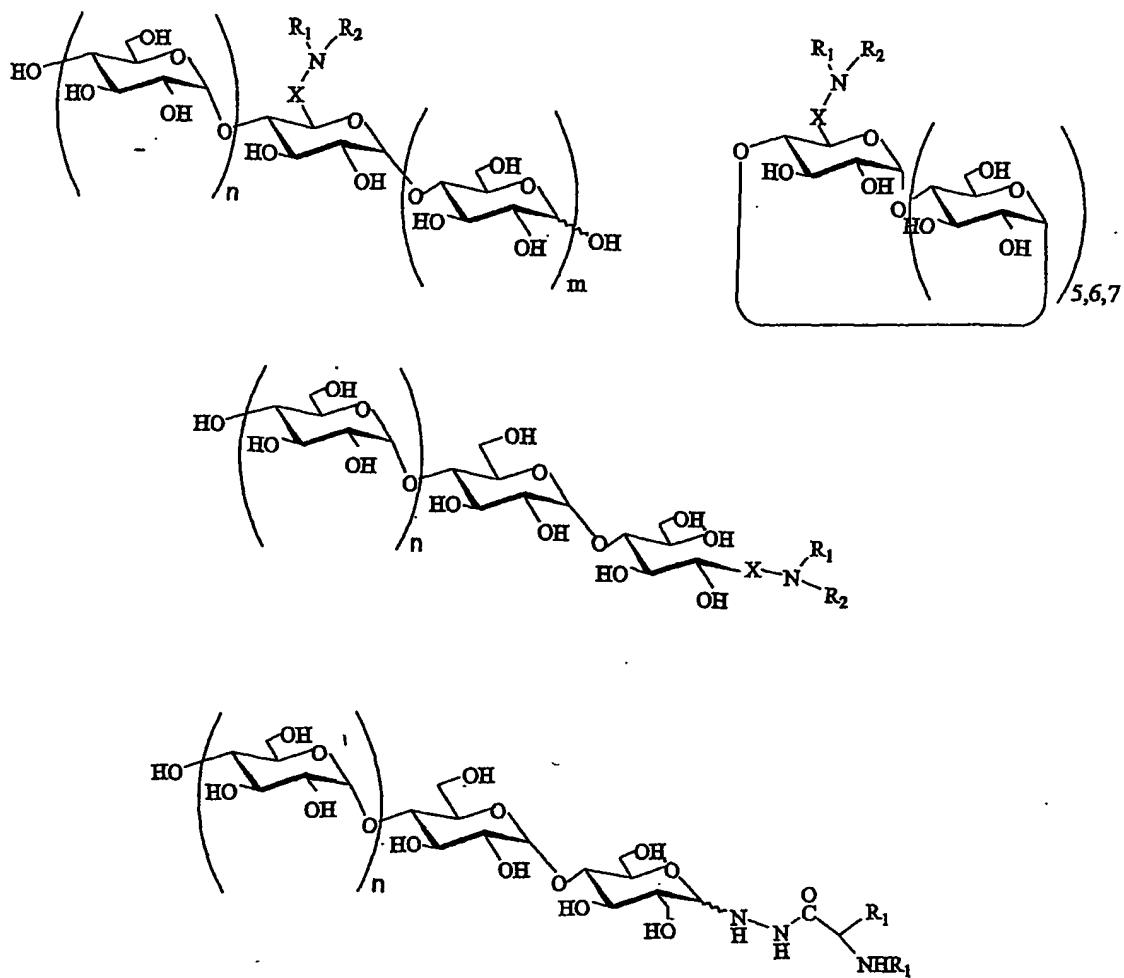
10

15

Sur la base de ce complexe et des interactions entre le ligand polyamine et la cible enzymatique, on peut proposer d'autres modèles de complexation, par exemple avec des polyamines de longueur variant entre 6 et 20 atomes, comportant au total au moins trois fonctions amines, dont une à chaque extrémité. L'une des amines terminales (ou celle à l'intérieur de la chaîne) peut être substituée par un substituant choisi parmi des oligo- ou polysaccharides linéaires ou cycliques, comportant 1 à environ 6 unités osidiques, et étant avantageusement le glucose, le maltose ou la cyclodextrine.

20

25 Dans le complexe de l'invention, l'enzyme est l' α -amylase et la polyamine est choisie parmi la spermidine et ses dérivés et répondant à l'une des formules générales suivantes :



$X = \text{CH}_2, \text{CO}$
 $R_1 = \text{H}, (\text{CHR}_3)_y[\text{NH}-(\text{CHR}_3)_z]-\text{NHR}_4$
 $R_2 = (\text{CHR}_3)_y[\text{NH}-(\text{CHR}_3)_z]-\text{NHR}_4$
 $R_3 = \text{H, alkyl, aryl, alkenyl, } \omega\text{-carboxyalkyl}$
 $R_4 = \text{H, alkyl, acyl}$
 $y, z = 3, 4$
 $l = 1, 2, 3$
 $m, n = 0 - 8$

ou répondant, de manière avantageuse, à cette formule générale :

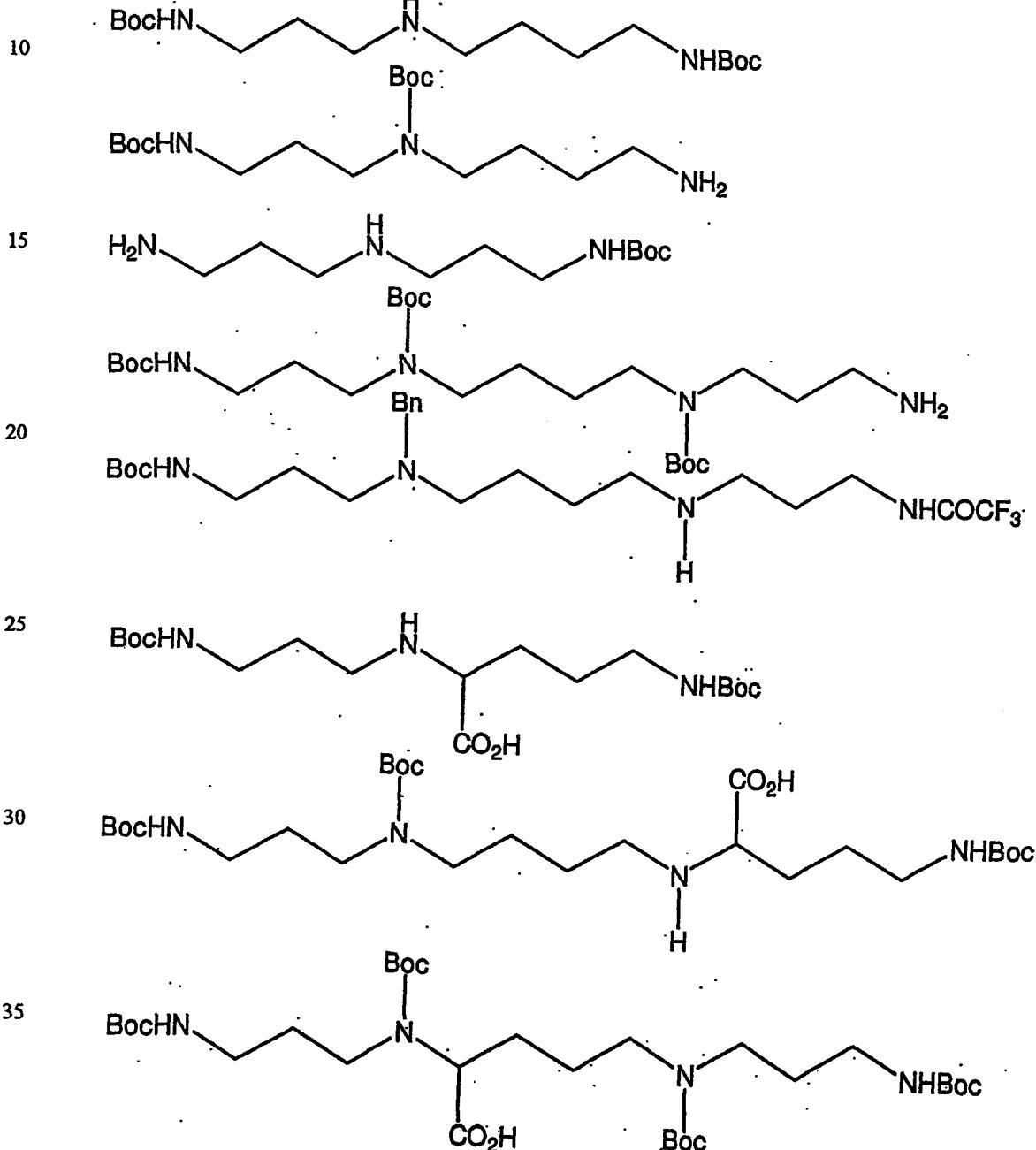
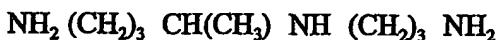


dans laquelle m et n sont compris entre 2 et 8, et dans laquelle le groupe R est soit H, soit un groupe glucose, soit un groupe maltooligosaccharide, soit un groupement aryl comprenant avantageusement 6 atomes de carbone soit un groupement alkyl comprenant avantageusement 6 atomes de carbone,

ou avantageusement aux formules suivantes :



5 $\text{NH}_2 (\text{CH}_2)_4 \text{NH} \text{CH}_2 \text{CH(CH}_3\text{)} \text{CH}_2 \text{NH}_2$



Bn = benzyle

Boc = butyloxycarbonyl,

la longueur des chaînes alkyle entre les atomes d'azote pouvant varier d'environ 2 à environ 8 carbones, et notamment d'environ 3 à environ 5 carbones, les chaînes alkyle pouvant également être substituées par des groupements chimiques comprenant préférentiellement une fonction aminée ou dérivée, les chaînes alkyle pouvant également comporter des atomes d'azote autres que ceux représentés sur les formules ci-dessus.

Le complexe selon l'invention peut être caractérisé par les caractéristiques cristallographiques suivantes :

- paramètres cristallins de la maille élémentaire : $a = 42,6 \text{ \AA}$
- $b = 80,6 \text{ \AA}$
- $c = 137,0 \text{ \AA}$
- $\alpha = \beta = \gamma = 90,0^\circ$

- 15
- système cristallin orthorhombique
 - groupe d'espace $P2_12_12_1$
 - nombre de molécules d'enzyme par maille cristalline de la maille élémentaire = 4

20 L'invention concerne également les nouvelles polyamines, susceptibles d'entrer dans la constitution du complexe défini ci-dessus et notamment constituée par une chaîne d'environ 6 à environ 20 atomes, notamment comportant d'environ 6 à environ 15, et avantageusement d'environ 6 à environ 10 atomes d'azote, avantageusement deux fonctions amines primaires, respectivement à chacune des extrémités de la polyamine, l'une au moins des fonctions amines étant éventuellement substituée par un substituant choisi parmi, les polysaccharides linéaires ou cycliques possédant d'environ 1 à environ 6 unités osidiques avantageusement le glucose, le maltose , ou la cyclodextrine et l'un au moins des atomes d'azote à l'intérieur de la chaîne étant éventuellement substitué par un substituant choisi parmi les oligosaccharides linéaires ou cycliques de 1 à 6 unités, notamment de 1 à 3 unités osidiques, notamment le glucose, le maltose ou la cyclodextrine

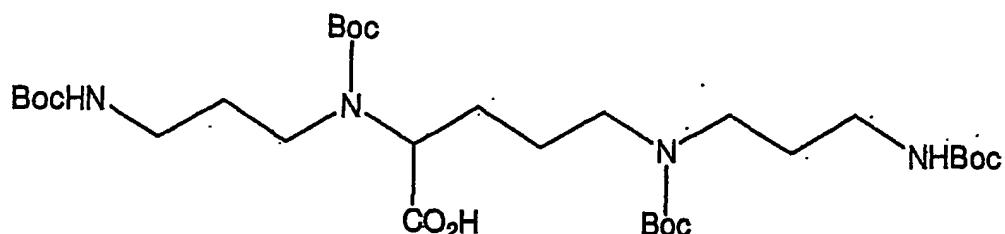
25

30

- sous réserve que la polyamine soit différente des produits suivants :

- la spermidine
- la spermine

5

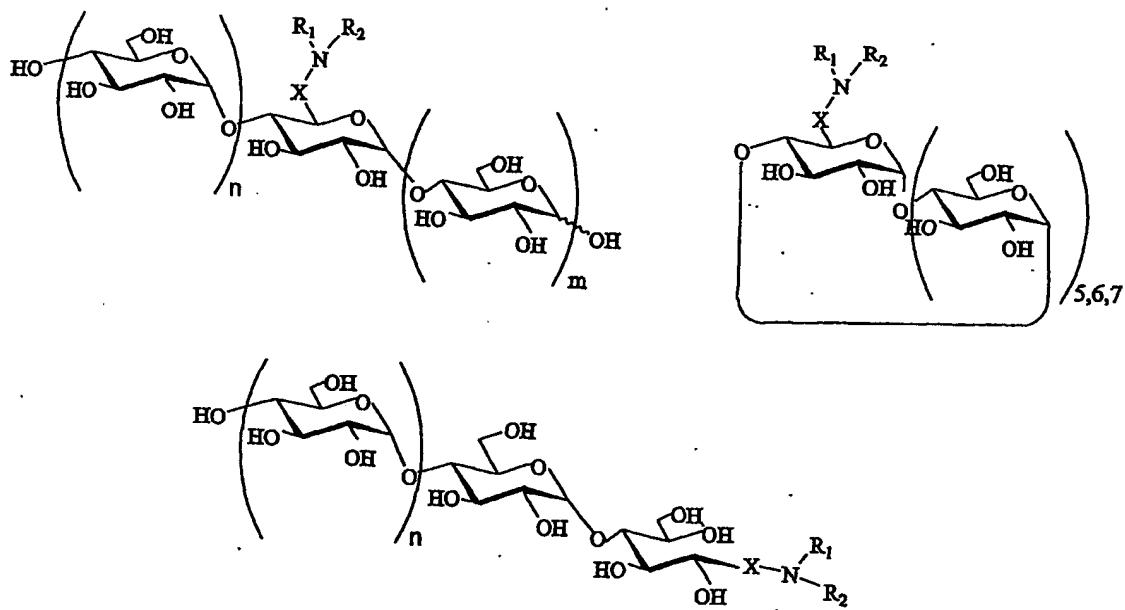


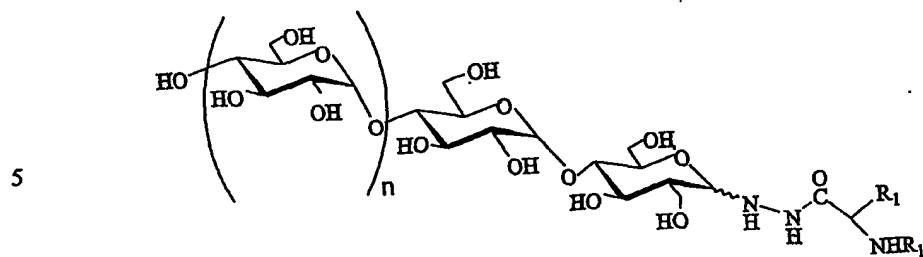
10

L'invention concerne donc également les nouvelles polyamines définies ci-dessus, susceptibles d'interagir avec le site actif de l'enzyme cible, selon un mode d'interaction similaire à celui observé expérimentalement dans l'état cristallin avec la spermidine en contact avec l'enzyme considérée.

15

L'invention concerne notamment les dérivés de polyamines de formule générale suivante :





X = CH₂, CO
 10 R₁ = H, (CH₂CH₃)_y[NH-(CH₂CH₃)_z]-NHR₄
 R₂ = (CH₂CH₃)_y[NH-(CH₂CH₃)_z]-NHR₄
 R₃ = H, alkyl, aryl, alkenyl, ω -carboxyalkyl
 R₄ = H, alkyl, acyl
 y, z = 3, 4
 l = 1, 2, 3
 m, n = 0 - 8

15

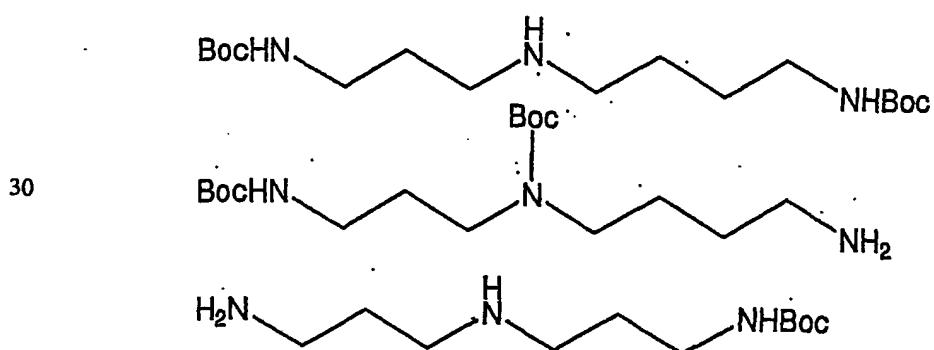
ou répondant, de manière avantageuse, à cette formule générale :



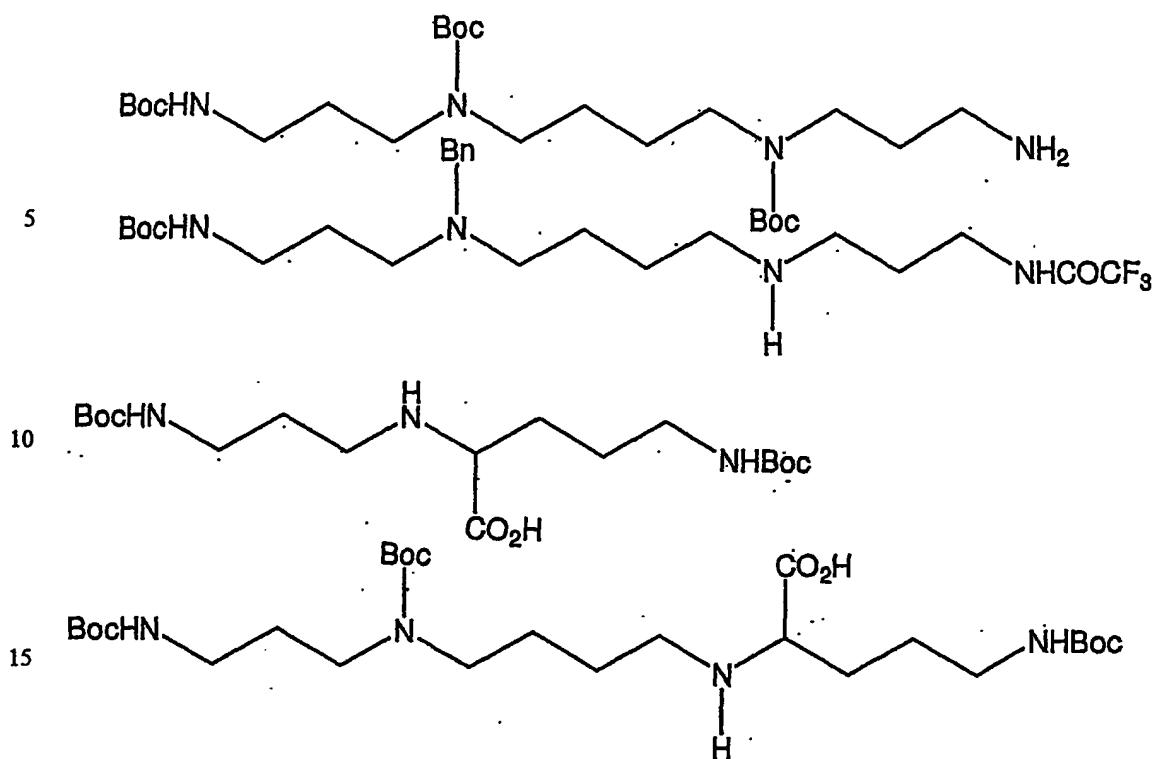
20 dans laquelle m et n sont compris entre 2 et 8, et dans laquelle le groupe R est soit H, soit un groupe glucose, un groupe maltooligosaccharide, soit un groupement aryl comprenant avantageusement 6 atomes de carbone, soit un groupement alkyl comprenant avantageusement 6 atomes de carbone,

ou à l'une des formules suivantes :

25



35



Bn = benzyle

20 Boc = butyloxycarbonyl,

la longueur des chaînes alkyle entre les atomes d'azote pouvant varier de environ 2 à environ 8 atomes de carbone, notamment de environ 3 à environ 5 atomes de carbone, les chaînes alkyle pouvant également être substituées par des groupements chimiques comprenant préférentiellement une fonction aminée ou dérivée, les chaînes alkyle pouvant également comporter des atomes d'azote autres que ceux représentés sur les formules ci-dessus.

25 Les polyamines de l'invention dont l'une des fonctions amine est substituée par une ou plusieurs unités osidiques, et désignées par glycoconjugués peuvent être synthétisées par des méthodes classiques en glycochimie (oxydation, amination réductive, couplage peptidique....).

30 Dans la formule de glycoconjugués de l'invention,

- lorsque X=CH₂, le greffage se fait par amination réductrice catalysée par le cyanoborohydrure de sodium entre les polyamines convenablement protégés et les oligosaccharides ayant une fonction aldéhydique en position 1 ou 6 et,

- lorsque X=CO, le greffage se fait par couplage peptidique entre les polyamines convenablement protégées et les oligosaccharides ayant une fonction acide en position 1 ou 6.

La synthèse de ces dérivés de polyamine permet de concevoir des inhibiteurs très spécifiques, ciblés vers une enzyme particulière, en l'occurrence celles de la famille des glycosidases impliquées dans les réactions aboutissant à la dégradation des sucres en molécules plus simples, jusqu'au glucose.

10

DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1 représente d'une part, la numérotation des atomes de la molécule de spermidine, et d'autre part le schéma des interactions entre les résidus AMY 1 et la molécule de spermidine dans le complexe AMY 1 / spermidine, de l'invention.

15

La Figure 2 représente la fonction densité électronique (déterminée à une résolution de 2.44 Å) du cristal du complexe AMY1 / spermidine dans la région du site actif. Le volume allongé de densité électronique correspond à la fixation d'une molécule de spermidine ($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$) dans la région active de l'enzyme.

20

La Figure 3 représente les interactions de la molécule de spermidine avec le site actif de l' α -amylase. L'affinité de la polyamine pour l'enzyme est largement due aux interactions par liaisons hydrogène avec les trois atomes d'azote.

25

La Figure 4 représente la superposition du complexe expérimental : AMY1 / spermidine (modèle «bâton» clair) et du modèle généré par les calculs de modélisation et dynamique moléculaires pour l' α -amylase de pancréas de porc / spermidine (modèle «bâton» foncé). Pour simplifier le schéma, les molécules d'eau ne sont pas représentées. Seuls les résidus interagissant avec la spermidine sont représentés. Les azotes de la spermidine (molécule linéaire au centre) sont montrés par des boules (N1, N6 et N10). Les résidus numérotés en italique appartiennent à AMY1.

30

La Figure 5 représente la superposition du complexe expérimental : AMY1 / spermidine (modèle «bâton» clair) et du modèle généré par les calculs de modélisation et dynamique moléculaires pour l' α -amylase salivaire humaine / spermidine (modèle «bâton» foncé). Pour simplifier le schéma, les molécules d'eau ne sont pas représentées.

Seuls les résidus interagissant avec la spermidine sont représentés. Les azotes de la spermidine (molécule linéaire au centre) sont montrés par des boules (N1, N6 et N10). Les résidus numérotés en italique appartiennent à AMY1.

La Figure 6 représente la superposition du complexe expérimental : AMY1 / spermidine (modèle «bâton» clair) et du modèle généré par les calculs de modélisation et dynamique moléculaires pour l' α -amylase de pancréas humain / spermidine (modèle «bâton» foncé). Pour simplifier le schéma, les molécules d'eau ne sont pas représentées. Seuls les résidus interagissant avec la spermidine sont représentés. Les azotes de la spermidine (molécule linéaire au centre) sont montrés par des boules (N1, N6 et N10).

Les résidus numérotés en italique appartiennent à AMY1.

La Figure 7 représente la superposition de 3 cycles du pseudo-tétrasaccharide inhibiteur acarbose (représenté par le modèle «bâton» foncé) et d'une molécule de spermidine (modèle «boule et bâtons» clair) dans leur configuration respective au sein du site actif d'une α -amylase d'orge.

La Figure 8 représente une formule plane des 3 cycles mentionnés ci-dessus correspondant à une molécule d'acarbose après coupure de la liaison α -1,4-interglycosidique aboutissant à la perte de l'unité glucose à l'extrémité réductrice.

20 EXEMPLES

COMPLEXES ENTRE LA SPERMIDINE OU DES DÉRIVÉS DE SPERMIDINE ET L' α -AMYLASE : PRÉPARATION DES COMPLEXES ET ÉTUDE PAR CRISTALLOGRAPHIE AUX R.X.

25

Conditions de cristallisation :

Les 9 résidus C-terminaux de l'isoenzyme 1 recombinant de l' α -amylase d'orge (AMY1) ont été coupés afin d'obtenir une extrémité C-terminale de même longueur que celle de l'isoenzyme 2 (AMY2). La protéine a été ensuite surexprimée dans *Pischia pastoris*, purifiée et concentrée.

30

La préparation de protéine utilisée pour la cristallisation a une concentration de 5.1 mg/ml et se trouve dans une solution de 10mM MES (2-[N]-Morpholino ethane sulfonic acid), 100mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, pH 6.7.

Les cristaux ont été obtenus par cocristallisation grâce au principe de diffusion de vapeur en utilisant la technique de goutte suspendue. Pour ce faire, à 2 µl de la solution de protéine décrite précédemment, ont été ajoutés 2.5 µl de polyéthylène glycol 8000 à 21% comme précipitant et 0.5 µl d'une solution de spermidine à 0.1M comme additif de cristallisation. Cette goutte a été équilibrée à 19°C contre un réservoir contenant 500 µl de polyéthylène glycol 8000 à 21%.

Les cristaux ont été alors trempés pendant 20 heures dans une solution de polyéthylène glycol 8000 à 21% contenant 10mM d'acarbose (un pseudo-tétrasaccharide).

Collection des données de diffraction :

La collection des données de diffraction a été conduite grâce à un générateur de rayons X (radiation CuK_α - longueur d'onde 1.5418 Å) à anode tournante (*Nonius 581*) opérant à 40kV et 90 mA (soit 3.6kW) avec un monochromateur en graphite couplé à un détecteur bidimensionnel de type Image Plate (*MarResearch 345*) de 34.5 cm de diamètre.

Un jeu de 180 clichés de diffraction (chacun correspondant à 1° d'oscillation du cristal) a été collecté à 15°C, le cristal étant monté en capillaire et positionné à 120 mm du détecteur, avec un temps d'exposition du cristal aux rayons X de 500s par cliché. La résolution la plus haute de ce jeu de données est de 2.44 Å.

Caractérisation du cristal :

L'intégration de ce jeu de données par le logiciel DENZO intégré dans le package marHKL (Otwinowski, 1993 et Minor, 1993) nous a permis de déterminer les caractéristiques cristallographiques de base : paramètres cristallins (a=42.6 Å, b=80.6 Å, c=137.0 Å, α=β=γ=90.0°), système cristallin (orthorhombique). Nous avons ensuite déterminé le groupe d'espace comme étant un P2₁2₁2₁. L'unité asymétrique est composée d'une molécule du complexe AMY1 / spermidine, ce qui correspond à un volume de solvant dans la maille de 53%.

Détermination de la structure 3D du complexe AMY1 / spermidine :

Les traitements ultérieurs des données ont été réalisés en utilisant les programmes de la suite CCP4 (CCP4, 1994). Ainsi, le logiciel Scala nous a permis de montrer que 161737 réflexions ont été enregistrées, ceci correspondant à 17066 réflexions uniques 5 avec un R_{sym} global de 13.6% et une complétude de 90.8%.

La méthode du remplacement moléculaire a été utilisée grâce au logiciel AmoRe (Navaza, 1994) avec comme modèle-guide la structure de l'isoenzyme 2 de l' α -amylase d'orge (AMY2 – code d'accès PDB : 1AMY) (Kadziola et al., 1994 et Kadziola et al., 1998) du fait de l'importante homologie de séquence (80%) entre ce modèle initial 10 et notre protéine d'intérêt (AMY1). Des phases d'affinement par les techniques de dynamique moléculaire (recuit simulé – Brünger et al., 1990) ont été réalisées par le logiciel CNS version 0.9a (Brünger et al., 1998) en alternance avec des manipulations du modèle. Ces dernières, comprenant l'insertion des molécules suscitées (eau, calcium, 15 spermidine et acarviosine) et l'affinement manuel des positions des chaînes latérales dans la densité électronique, ont été réalisées avec le logiciel TURBO-FRODO (Roussel & Cambillau, 1991). Pour ce faire, des cartes de densité électronique $2F_o - F_c$ et $F_o - F_c$ ont été calculées.

Nous avons ainsi obtenu la structure du complexe AMY1 / spermidine final affiné 20 contenant 3118 atomes non-hydrogène appartenant à la protéine elle-même (soit 405 acides aminés) et 153 molécules d'eau, 3 atomes de calcium, une molécule d'acarviosine (produit de dégradation du pseudo-tétrasaccharidé acarbose) et une molécule de spermidine.

La structure considérée se caractérise par un facteur R de 17,2% et un facteur R_{libre} 25 de 20,3% (ce dernier étant basé sur 10% de données de diffraction sélectionnées aléatoirement – Brünger, 1992). Les statistiques complémentaires concernant cette structure sont présentées dans le tableau ci-dessous.

La stéréochimie du modèle final a été examinée avec le logiciel PROCHECK (Laskowski et al., 1993) et 85.6% des résidus (non glycine ou proline) sont localisés dans des régions les plus favorables. Enfin, aucun résidu n'a été localisé dans les régions 30 non autorisées.

Statistiques et collection de données et d'affinement pour le complexe AMY1 / spermidine :

	Résolution (Å)	2.44
	Complétude des données (%)	90.8
5	Complétude des données dans la coquille de résolution la plus élevée (%)	90.8
	Coquille de résolution la plus élevée (Å)	2.44 - 2.50
	Nombre total de réflexions	161737
	Nombre de réflexions uniques	17066
10	Facteur R _{sym} global (%) (*)	13.6
	Redondance	4.1
	Coefficient de corrélation AmoRe (%)	70.4
	Facteur R AmoRe (%)	35.0
15	Facteur R moyen (%) (**)	17.2
	Facteur R _{libre} moyen (%)	20.3
	Nombre total d'atomes (non hydrogène)	3305
20	Nombre de molécules d'eau	153

$$(*) R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I(hkl)} \text{ et } (**) R = \frac{\sum_h |F_{obs}(h) - k| F_{calc}(h)|}{\sum_h |F_{obs}(h)|}$$

avec k, un facteur d'échelle.

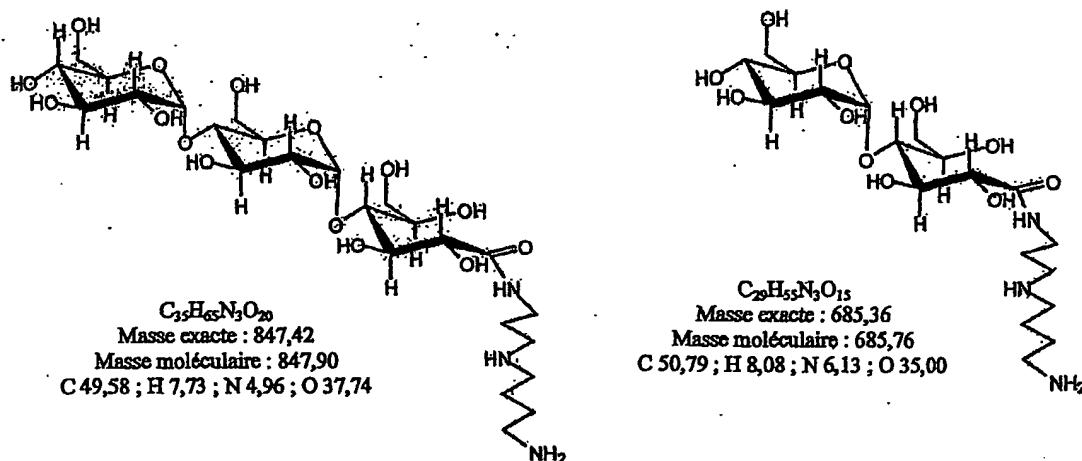
25 **Intérêt des molécules de type glycopolymérite :**

L'une des propositions majeures résultant de l'analyse du complexe AMY1/spermidine, est de profiter de l'existence d'acides aminés aromatiques dans le site actif des glycosidases pour concevoir des polyamines avec des greffes d'unités glucose, afin d'augmenter le pouvoir d'inhibition de la molécule dérivée. En effet, il 30 est établi que les interactions hydrophobes entre les cycle sucre et les noyaux des acides aminés aromatiques sont un élément essentiel dans la reconnaissance protéine / carbohydrate.

C'est pour cela que l'on a étudié les molécules de type glycopolymérite, qui intègrent des possibilités d'interactions variées avec les glycosidases, d'une part grâce aux charges positives (groupements NH) du squelette polyamine, d'autre part grâce

aussi aux interactions entre les sucres greffés avec des chaînes latérales aromatiques du site actif. Par exemple, les molécules suivantes, qui sont des conjugués spermidine - maltooligosaccharides et dont les protocoles de synthèse sont détaillés ci-après, représentent de bons candidats, inhibiteurs des α -glycosidases :

5



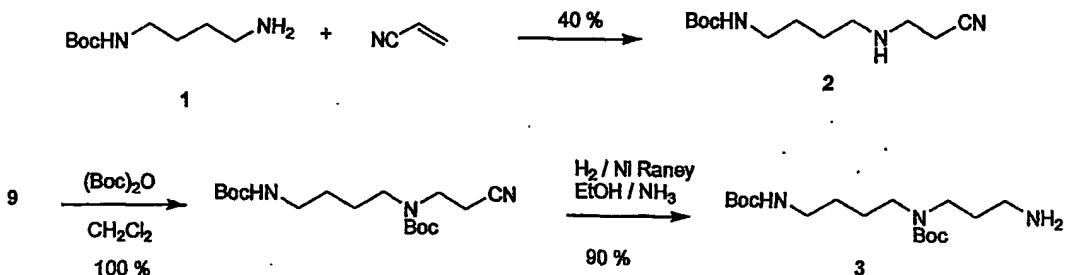
Synthèses des conjugués spermidine-maltooligosaccharides :

10

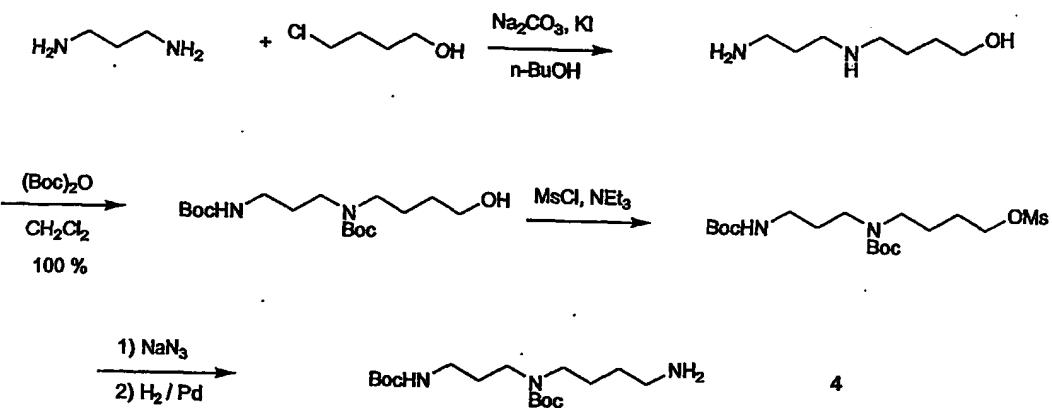
1- Synthèse des dérivés spermidine protégés

15

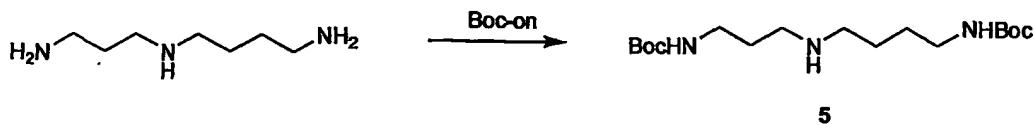
La spermidine 3 N' , N^{θ} -diprotégée est obtenue en trois étapes à partir de la putrescine monoprotégée 1. La première étape est une addition de type Michaeli de la putrescine sur l'acrylonitrile générant ainsi le nitrile correspondant. La fonction amine secondaire du dérivé 2 est ensuite protégée par un groupement *tert*-butyloxycarbonyle. Enfin, l'hydrogénéation du groupement nitrile en présence de Nickel de Raney dans une solution d'ammoniac éthanolique conduit à la spermidine 3 diprotégée (Humora et al., 1979).



La spermidine 4 *N,N'*-diprotégée est obtenue en trois étapes à partir de la putrescine. La première étape est une alkylation par le 4-chloro-butan-1-ol, suivie de la protection des deux fonctions amines par des groupements *tert*-butyloxycarbonyles. Après transformation en mésylate, introduction d'un N₃, et réduction, on obtient le composé attendu (Levchine et al., 1994).



10 Enfin, la spermidine 5 *N*¹,*N*⁸-diprotégée est directement obtenue à partir de la spermidine par traitement avec le *tert*-butyloxycarbonyloxyimino-2-phenylacetonitrile (Boc-on) pendant 1h à 0°C (Hesse et al., 1996).



15 2-Oxydation des oligosaccharides

L'oligosaccharide 6 (35 mmol) est mis en solution dans un mélange eau-méthanol (36 mL, [1:3]), puis est ensuite additionné d'une solution d'iode (17 g) dans le méthanol

(240 mL) et chauffé à 40°C. Une solution de potasse (16 g) dans le méthanol (400 mL) est ensuite additionnée et le mélange réactionnel agité vigoureusement à 40°C pendant 35 minutes. A la fin de cette période, on observe la disparition de la coloration et l'apparition d'un précipité blanc-jaune. Le mélange réactionnel est alors refroidi dans un bain de glace et la suspension est filtrée sur büchner, puis rincée au méthanol froid puis à l'éther éthylique. Le solide recueilli est repris dans un minimum d'eau puis précipité à nouveau par addition de méthanol. Le solide est ensuite séché, repris dans l'eau puis lyophilisé, pour donner l'oligosaccharide oxydé sous forme de sel de potassium 7 (Kobayashi et al., 1985).

Le sel d'acide en solution d'eau (60 mL) est traité par de la résine Amberlite IRN 77 H⁺ (15 g) pendant 30 minutes. La résine est ensuite filtrée et le filtrat concentré *in vacuo* et coévaporé plusieurs fois avec successivement du méthanol et de l'éthanol pour donner un résidu solide qui est repris dans l'eau puis lyophilisé pour donner la lactone correspondante 8.

15

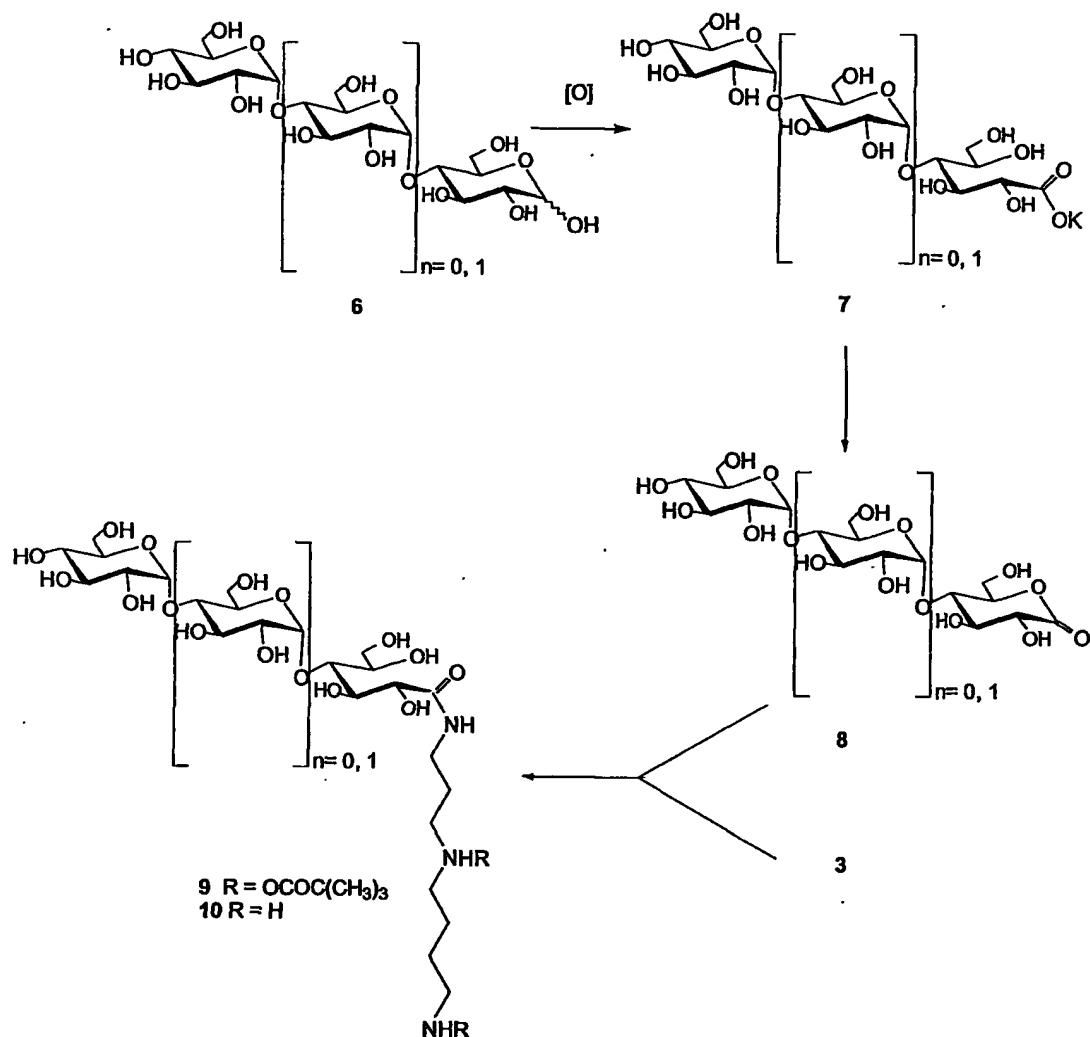
3- Couplage des lactones 8 au dérivé spermidine protégé 3

Une suspension de lactone 8 (2,1 mmol) et de dérivé spermidine 3 (1,5 mmol) dans le méthanol (50 mL) est portée au reflux pendant 2 h. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à température ambiante, puis additionné de gel de silice (Geduran SI 60 ; 0,04-0,063 mesh) et concentré *in vacuo*. Le solide résultant est ensuite déposé au sommet d'une colonne de chromatographie de type Flash) et l'application d'un gradient de chloroforme-méthanol (chloroforme 100% à [3:2]) permet d'isoler le conjugué spermidine protégé 9, qui après concentration est repris dans l'eau puis lyophilisé.

25

4- Déprotection du conjugué spermidine 9

Le conjugué spermidine 8 (2 mmol) est traité par de l'acide trifluoroacétique dans l'eau (30 mL, [9:1]) pendant 30 mn à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite concentré *in vacuo* et le solide est repris dans l'eau et lavé 3 fois à l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est ensuite lyophilisée pour donner le conjugué spermidine 10.



RECONNAISSANCE SPERMIDINE/ α -AMYLASES DE DIVERSES ORIGINES

PAR LES METHODES DE MODELISATION MOLECULAIRE ET DE

BIOINFORMATIQUE

5

Disposant des structures 3D d'autres α -amylases d'origines diverses et des ensembles de coordonnées atomiques correspondants, il a été décidé d'étendre l'analyse, notamment aux enzymes homologues de mammifères (homme, porc), compte tenu des fortes implications potentielles thérapeutiques et pharmacologiques.

10

1) Protéines α -amylases étudiées :

Dans le but d'explorer les propriétés d'inhibition potentielles de la spermidine envers d'autres membres de la famille des α -amylases, des études de simulation d'interaction entre la spermidine et des α -amylases de diverses origines ont été effectuées par la méthode de modélisation moléculaire assistée par ordinateur. Ainsi, on a utilisé, pour cette étude, 3 structures cristallines d' α -amylases connues et déterminées à haute résolution par la méthode de cristallographie de diffraction aux rayons X. Ce sont :

- l' α -amylase de pancréas de porc, résolue à 2.2 Å en complexe avec l'acarbose, structure déposée dans la Protein Data Bank sous le code d'accès 1PPI (Qian et al., 1994),
- l' α -amylase salivaire humaine, résolue à 1.6 Å – Structure déposée dans la Protein Data Bank sous le code d'accès 1SMD (Ramasubbu et al., 1996),
- l' α -amylase pancréatique humaine, résolue à 1.8 Å – Structure déposée dans la Protein Data Bank sous le code d'accès 1HNY (Brayer et al., 1995).

2) Matériels et méthodes :

Dans le but de réaliser ces études d'interaction entre la spermidine et les α -amylases suscitées par la méthode de modélisation moléculaire, on a, dans un premier temps, superposé les 3 structures avec celle du complexe AMY1 / spermidine. Cette superposition a été effectuée en superposant les carbones α des 3 résidus catalytiques de chacune de ces structures, de façon à faire coïncider au mieux les sites actifs de ces 4 structures.

Nom	Résidus catalytiques		
	180	205	291
Amylase d'orge isoenzyme 1 / spermidine	180	205	291
Amylase de pancréas humain	197	233	300
Amylase salivaire humaine	197	233	300
Amylase de pancréas de porc / acarbose	197	233	300
	Nucléophile	Acide/base	Acide/base

Dans le site actif de chacune des α -amylases considérées, la molécule de spermidine a été modélisée dans sa conformation originelle, en conservant les interactions observées pour le complexe AMY1/spermidine. L'ensemble des manipulations des structures (superposition et insertion de la spermidine dans le site actif) a été effectué avec le logiciel TURBO-FRODO (Roussel et al., 1991).

Enfin, pour chacune des trois structures dans lesquelles avait été insérée la spermidine, on a effectué une série de cycles de minimisation d'énergie.

Cette minimisation d'énergie basée sur la méthode de Powell a été conduite grâce au logiciel CNS version 1.0 (Brünger et al., 1998).

Cette étape a eu pour but de minimiser l'énergie du système, premièrement, en déplaçant les atomes qui pouvaient établir de mauvais contacts entre eux (notamment les molécules d'eau qui n'avaient pas été déplacées lors de l'insertion de la spermidine dans le site actif), mais aussi de positionner les atomes de façon à maximiser les interactions par liaison hydrogène entre eux et aller donc vers un modèle de structure le plus stable énergétiquement.

Enfin, l'examen des modèles de structure obtenus a été effectué avec le logiciel TURBO-FRODO.

20

3) Résultats :

Les modèles calculés de complexes potentiels entre les 3 α -amylases suscitées montrent :

- 25 – dans un premier temps, aucun des modèles ne révèle de mauvais contacts après fixation d'une molécule de spermidine dans leurs sites actifs respectifs. De fait chaque acide aminé, chaque molécule d'eau, mais aussi la spermidine insérée se sont accommodés au mieux au sein du site actif dans le processus de minimisation d'énergie.
- 30 – de plus dans un second temps, on peut constater dans les modèles la formation de nombreuses liaisons hydrogène permettant de lier et stabiliser la spermidine dans le site actif des trois α -amylases étudiées. Les interactions directes pour ces trois modèles sont résumées dans les tableaux ci-après (la numérotation des atomes de la spermidine

obéit au schéma présenté plus haut). Il est important de noter que sont présentées ici seulement les interactions de premier niveau. Chaque molécule d'eau mentionnée présente au moins deux liaisons hydrogène la stabilisant. Aucune molécule d'eau citée n'est isolée (voir Figures 4, 5 et 6).

5

Tableau des interactions entre la spermidine et l' α -amylase de pancréas de porc

	Atomes de la spermidine	Résidus ou eau	Distance (\AA)
10	N1	Lys 200 N ζ	3.4
	N1	Tyr 151 OH	3.7
	N6	Glu 233 O ϵ 2	3.5
	N6	Wat 610	3.7
	N10	Asp 197 O δ 1	2.8
	N10	Asp 197 O δ 2	3.6

15

20

Tableau des interactions entre la spermidine et l' α -amylase salivaire humaine

	Atomes de la spermidine	Résidus ou eau	Distance (\AA)
25	N1	Lys 200 N ζ	2.8
	N1	Wat 667	3.8
	N6	Wat 646	2.5
	N6	Wat 586	3.7
	N10	Asp 197 O δ 1	3.6
	N10	Asp 197 O δ 2	3.7
	N10	Glu 233 O ϵ 1	3.8
	N10	Wat 563	2.4
	N10	Wat 578	2.3
	N10	Wat 586	3.7
	N10	Wat 604	2.7

35

Tableau des interactions entre la spermidine et l'α-amylase pancréatique humaine

	Atomes de la spermidine	Résidus ou eau	Distance (Å)
	N1	Lys 200 N ζ	3.5
5	N1	Wat 827	2.7
	N6	Glu 233 Oε2	3.7
	N6	Wat 738	2.4
	N10	Asp 197 Oδ1	2.9
	N10	Asp 197 Oδ2	3.6
10	N10	Glu 233 Oε1	3.1
	N10	Wat 509	2.4
	N10	Wat 594	3.8
	N10	Wat 730	2.8
	N10	Wat 738	2.9
15			

4) Discussion et conclusion :

Aucun des trois modèles de complexe amylase-spermidine ne révèle de mauvais contacts entre la molécule de spermidine et les enzymes respectives. Ainsi, dans la région active de l'enzyme et au cours du processus de minimisation d'énergie, chaque résidu d'acide aminé, chaque molécule d'eau mais aussi la spermidine insérée se positionnent en respectant une stéréochimie optimale pour assurer une inhibition adéquate du système. Le nombre de liaisons hydrogène directes entre la spermidine et un résidu ou une molécule d'eau est donné dans le tableau suivant pour le complexe expérimental AMY1 / spermidine et pour les 3 modèles calculés : α-amylase de pancréas de porc / spermidine, α-amylase salivaire humaine / spermidine et α-amylase pancréatique humaine / spermidine.

30	<u>Liaisons hydrogène directes avec</u>	<u>un résidu</u>	<u>une molécule d'eau</u>
	AMY1/spermidine	5	4
	α-amylase pancréas porc/spermidine	5	1
	α-amylase salivaire hum./spermidine	4	7
	α-amylase pancréas hum./spermidine	5	6

On constate ainsi que la spermidine est capable, d'après ces modèles, de réaliser 4 ou 5 liaisons hydrogène directes avec un résidu des α -amylases étudiées et de faire 1, 6 ou 7 liaisons hydrogène avec des molécules d'eau présentes dans le site actif, elles-mêmes stabilisées par d'autres liaisons hydrogène.

D'après cette étude, on voit par exemple que le complexe α -amylase de pancréas de porc / spermidine est stabilisé par un total de 6 liaisons H contre 11 pour les modèles α -amylase salivaire humaine / spermidine et α -amylase de pancréas humain / spermidine ou 9 pour la structure expérimentale AMY1 / spermidine.

Ainsi, ces modèles montrent la parfaite adéquation entre la spermidine et les sites actifs de plusieurs α -amylases. Il est tout aussi important que les deux modèles les plus favorables en terme d'interaction site actif / spermidine par liaisons hydrogène sont ceux des α -amylases humaines de salive et de pancréas. Ces observations confortent le fait que la spermidine ou ses dérivés polyaminiques sont des molécules de choix pour la conception d'inhibiteurs à visée thérapeutique humaine contre le diabète et d'autres désordres métaboliques comme l'obésité.

MODES D'INHIBITION COMPARES DES MOLECULES SPERMIDINE ET ACARBOSE (GLUCOR[®])

L'acarbose, un pseudo-tétrasaccharide (un médicament anti-diabète (GLUCOR[®] de Bayer) sur le marché), se lie aux amylases pour bloquer le site actif, comme il a été montré avec différentes amylases d'origines diverses, et notamment l'enzyme porcine. La Figure 8 montre une molécule d'acarbose tronquée à l'extrémité réductrice (à droite de la figure), après coupure de l'unité glucose terminale.

De même, la structure du complexe entre l'isoenzyme 2 de l' α -amylase d'orge et l'acarbose a été résolue à l'échelle atomique dans notre laboratoire (Kadziola et al., 1998). De plus, la structure du complexe entre l'isoenzyme 1 de l' α -amylase d'orge et l'acarbose a été très récemment résolue à une résolution de 2.1 Å par la méthode de cristallographie de diffraction des rayons X.

28.

La superposition des structures 3D du complexe entre l'isoenzyme 2 de l' α -amylase d'orge / acarbose et du complexe isoenzyme 1 de l' α -amylase d'orge / spermidine au niveau du site actif a permis de montrer la remarquable superposition de 3 cycles du pseudo-tétrasaccharide inhibiteur acarbose et de la spermidine (voir Figure 7). Ce résultat a été confirmé par la détermination du complexe isoenzyme 1 de l' α -amylase d'orge / acarbose. Cette grande analogie structurale entre ces molécules inhibitrices est également observée dans leurs complexes avec des enzymes homologues de mammifères.

10 L'analogie observée ci-dessus entre les parcours tridimensionnels de la spermidine et de l'acarbose au contact du même enzyme est tout à fait remarquable. De fait, ce mimétisme structural est assuré par des molécules radicalement différentes en termes de nature, composition chimique et propriétés générales. Elles exercent toutes deux une action d'inhibition des α -amylases, et très probablement d'autres glycosidases, compte tenu des similitudes des sites actifs de ces différentes hydrolases. Ces résultats renforcent encore la possibilité de concevoir des dérivés de polyamines, comme les glycopolymères proposées ci-dessus, pour la mise au point d'agents thérapeutiques et pharmacologiques efficaces dans le traitement de désordres métaboliques liés à l'absorption de sucres et/ou aux perturbations de sa régulation (diabète, obésité, 15 hyperglycémie..).

15

20

Bibliographie :

- Brayer G. D., Y. Luo, et al. (1995). The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci* 4(9), 1730-42.
- Brünger A.T., Krukowski A. & Erickson J. (1990) Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing. *Acta Cryst. A* 46, 585-593.
- Brünger A.T. (1992). X-PLOR, Version 3.1. A system for X-Ray Crystallography and NMR. Yale University Press, New Haven, CT.
- Brünger A.T. (1992). The free R-value : a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355, 472-474.
- Brünger A.T., Adams P.D., Clore G.M., Delano W.L., Gros P., Grosse-Kunstleve R.W., Jiang J.-S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N.S., Read R.J., Rice L.M., Simonson T., Warren G.L. (1998). Crystallography & NMR System. *Acta Cryst. D* 54, 905-921.
- Collaborative Computational Project Number 4. (1994). The CCP4 suite : Programs for protein crystallography. *Acta Cryst. D* 50, 760-763.
- Hesse M., Hu W. (1996) *Helv. Chim. Acta*, 79, 548.
- Humora M., Quick J. (1979) *J. Org. Chem.* 44, 1166).
- Kadziola A., Abe J., Svensson B. & Haser R. (1994) Crystal and molecular structure of barley α -amylase. *J. Mol. Biol.* 239, 104-121.
- Kadziola A., SØgaard M., Svensson B. & Haser R. (1998) Molecular structure of a barley α -amylase-inhibitor complex : Implications for starch binding and catalysis. *J. Mol. Biol.* 278, 205-217.
- Kobayashi K., Sumitomo H., Ina Y. (1985) *Polymer J.* 17, 567.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. (1993). PROCHECK : a program to check the stereochemistry of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.
- Levchine I., Rajan P., Borloo M., Bollaert W., Haermes A. (1994) *Synthesis*, 37).
- Minor, W. (1993). XDISPLAYF program. Purdue University, West Lafayette, IN.
- Navaza, J. (1994). AmoRe : an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst. A* 50, 157-163.

Otwinowski, Z. (1993) Oscillation data reduction program. In Proceedings of the CCP4 study weekend : Data Collection and Processing (Sawyer, L., Isaacs, N. and Bailey, S. eds), pp. 56-62, SERC Daresbury Laboratory, England.

5 Qian, M., R. Haser, et al. (1993). Structure and molecular model refinement of pig pancreatic alpha- amylase at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* 231(3), 785-99.

Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y. G., Brayer, G. D., Levine, M. J. (1996) Structure of human salivary alpha-amylase at 1.6 Å resolution : Implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallogr D* 52, 435.

10 Roussel, A. & Cambillau, C. (1991) In Silicon Graphics Geometry Directory 86. Silicon Graphics, Moutain View, CA.

RE V E N D I C A T I O N S

5

1. Utilisation d'un dérivé de polyamine ou d'une polyamine pour inhiber le site actif des enzymes glycosidases intervenant dans la transformation de polysaccharides en sucres, notamment en glucose, dans un organisme vivant.

10

2. Utilisation d'un dérivé de polyamine ou d'une polyamine pour la préparation d'un médicament destiné au diagnostic, à la prévention ou au traitement de pathologies impliquant des désordres métaboliques liés aux glycosidases, et plus particulièrement une dérégulation de l'absorption intestinale de glucose, telles que le diabète non-insulino dépendant, l'obésité, l'hyperglycémie, ou l'hyperlipidémie.

15 3. Utilisation selon la revendication 1 à 2 de polyamines, comprenant au moins 2 charges positives, notamment au moins 3 fonctions amines, et le cas échéant au moins 1 fonction osidique (ou saccharidique) linéaire ou ramifiée, lesdites charges positives, notamment lesdites fonctions amines, étant espacées par des chaînes carbonées dont la longueur d'environ 2 atomes de carbone à environ 8 atomes de carbone, notamment d'environ 3 atomes de carbone à environ 5 atomes de carbone.

20 4. Complexe entre une polyamine et une enzyme glycosidase, notamment glycosyl hydrolase et plus particulièrement α -amylase, présente dans tous les organismes vivants et responsable des réactions de transformation et d'hydrolyse d'oligosaccharides et de polysaccharides en molécules osidiques plus simples comme le maltose et le glucose, dans lequel la polyamine est fixée au niveau du site actif de l'enzyme, notamment par des liaisons hydrogène mettant en jeu les charges positives de la polyamine, correspondant à ses fonctions amines, et les fonctions carboxyliques de chaînes latérales d'acides aminés de la susdite enzyme, le nombre de liaisons hydrogène étant avantageusement d'au moins 4.

30

5. Complexe selon la revendication 4, dans lequel au moins deux des sous-sites du site actif de l'enzyme sont impliqués dans la liaison avec la susdite polyamine.

10 6. Complexe selon l'une quelconque des revendications 4 ou 5, dans lequel l'enzyme est l' α -amylase, notamment l' α -amylase d'orge (AMY 1) et les quatre acides aminés suivants de l'enzyme : Glu (205), Trp (207), Asn (209), Asp (180) sont impliqués dans la liaison avec la polyamine.

15 7. Complexe selon l'une des revendications 4 à 6, notamment entre l' α -amylase et la spermidine comportant l'une au moins des interactions suivantes, et notamment l'ensemble des interactions suivantes, qui sont des liaisons de type hydrogène et qui peuvent être définies comme indiqué ci-après :

15 Atomes de la Spermidine : Résidus d'AMY1 ou eau : Distance (\AA) :

Numéro de l'atome d'azote

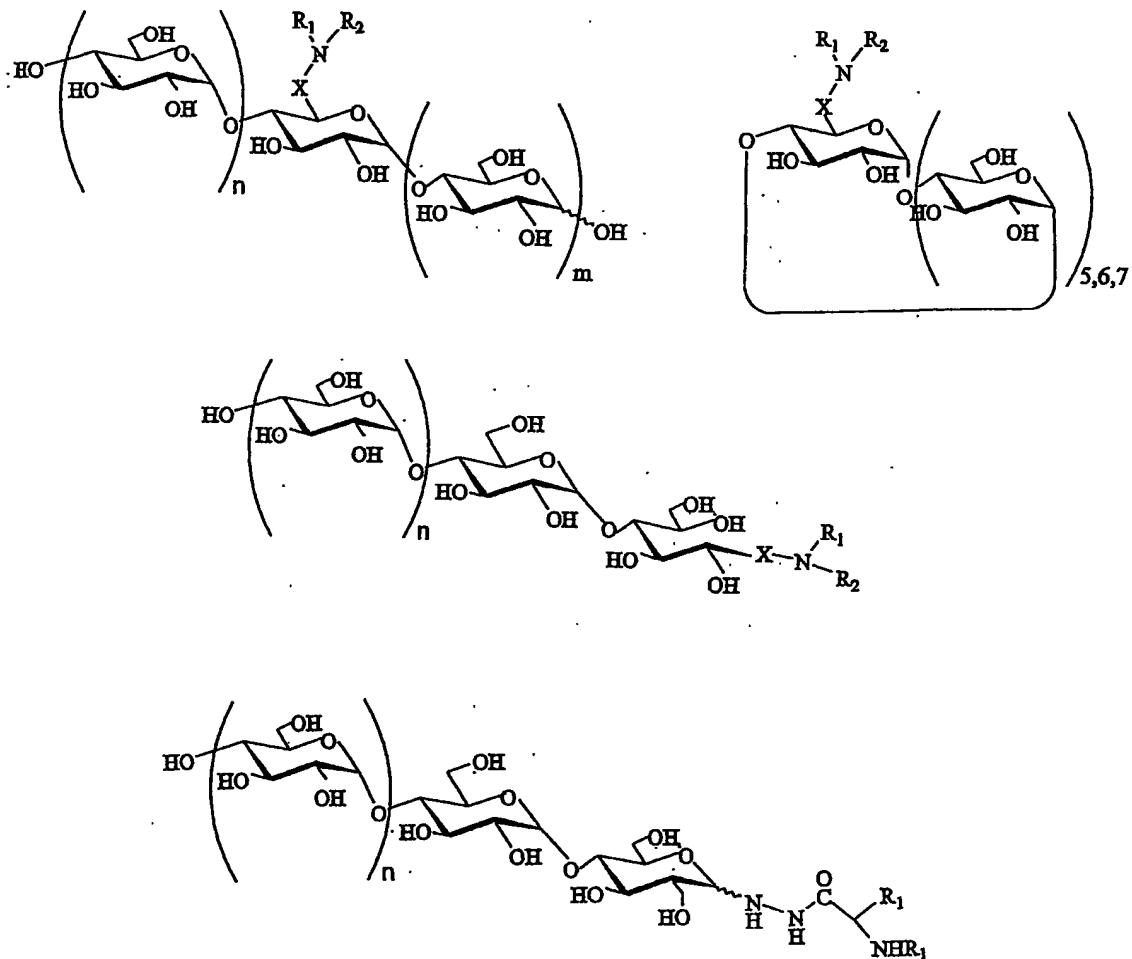
N1	W207 N ϵ 1	3.7
N1	N209 O δ 1	3.4
N1	Wat 1250	3.1
N6	E205 O ϵ 2	3.7
N10	D180 O δ 1	2.7
N10	D180 O δ 2	3.7
N10	Wat 1087	2.8
N10	Wat 1102	2.9
N10	Wat 1259	2.8

20 8. Complexe selon l'une des revendications 4 à 6, dans lequel la polyamine est une chaîne d'environ 6 à environ 20 atomes, notamment comportant d'environ 6 à 15, et avantageusement d'environ 6 à 10 atomes d'azote, avantageusement deux fonctions amines primaires, respectivement à chacune des extrémités de la polyamine, l'une au moins des fonctions amines étant éventuellement substituée par un substituant choisi parmi, les polysaccharides linéaires ou cycliques possédant, d'environ 1 à 35 environ 6 unités osidiques avantageusement le glucose, le maltose, ou la cyclodextrine, et l'un au moins des atomes d'azote à l'intérieur de la chaîne étant

éventuellement substitué par un substituant choisi parmi les oligosaccharides, linéaires ou cycliques, de 1 à 6, notamment 1 à 3 unités osidiques, notamment le glucose, le maltose ou la cyclodextrine.

5. 9. Complexe selon l'une des revendications 4 à 8, selon lequel

- l'enzyme est l' α -amylase et
- la polyamine est choisie parmi la spermidine et ses dérivés, ladite polyamine répondant à l'une des formules générales suivantes :



$X = \text{CH}_2, \text{CO}$

$R_1 = \text{H}, (\text{CHR}_3)_y[\text{NH}-(\text{CHR}_3)_z]-\text{NHR}_4$

$R_2 = (\text{CHR}_3)_y[\text{NH}-(\text{CHR}_3)_z]-\text{NHR}_4$

$R_3 = \text{H, alkyl, aryl, alkenyl, } \omega\text{-carboxyalkyl}$

$R_4 = \text{H, alkyl, acyl}$

$y, z = 3, 4$

$l = 1, 2, 3$

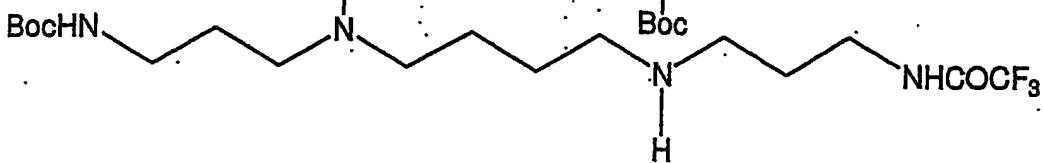
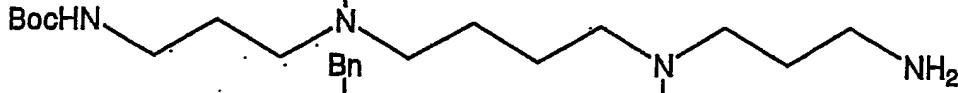
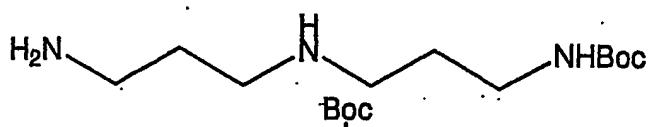
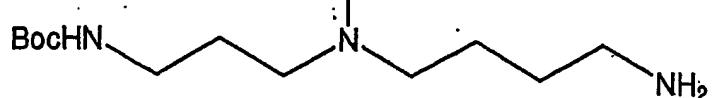
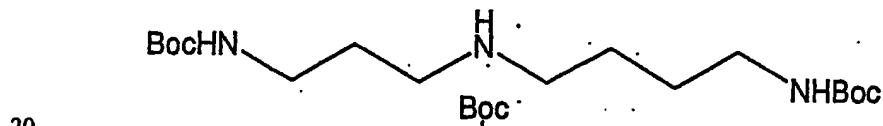
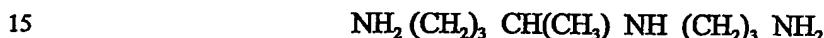
$m, n = 0 - 8$

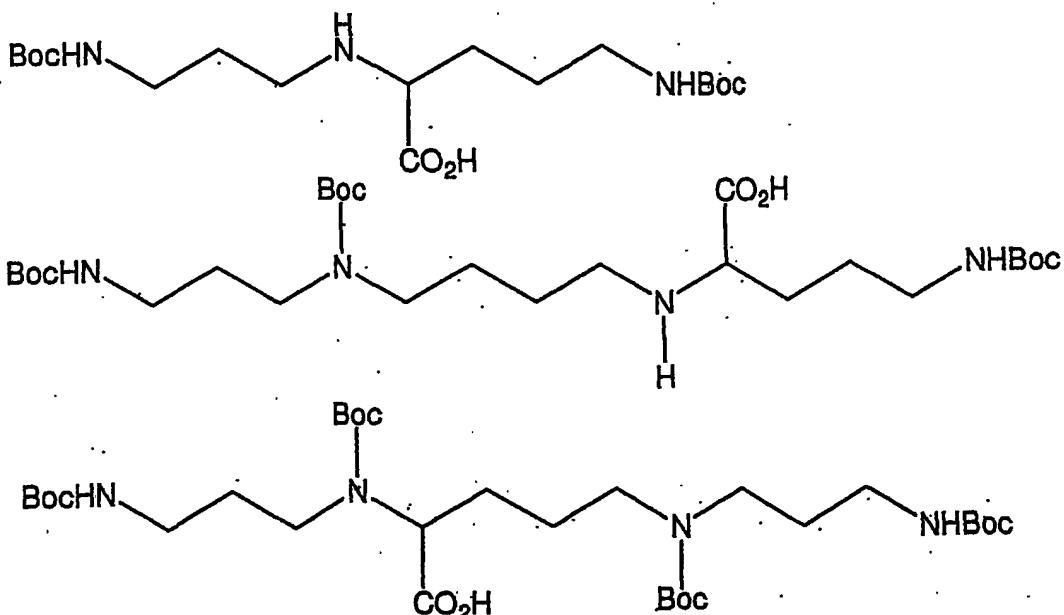
ou répondant, de manière avantageuse, à cette formule générale :



dans laquelle m et n sont compris entre 2 et 8, et dans laquelle le groupe R est soit H, soit un groupe glucose, soit un groupe maltooligosaccharide, soit un groupement aryl comprenant avantageusement 6 atomes de carbone, soit un groupement alkyl comprenant avantageusement 6 atomes de carbone,

ou avantageusement aux formules suivantes :





15

Bn = benzyle

Boc = butyloxycarbonyl,

la longueur des chaines alkyle entre les atomes d'azote pouvant varier d'environ
20 2 à environ 8 carbones, et notamment d'environ 3 à environ 5 carbones, les chaînes alkyle pouvant également être substituées par des groupements chimiques comprenant préférentiellement une fonction aminée ou dérivée, les chaînes alkyle pouvant également comporter des atomes d'azote autres que ceux représentés sur les formules ci-dessus.

25

10. Complexé selon l'une des revendications 4 à 9, ayant les caractéristiques cristallographiques suivantes :

- paramètres cristallins de la maille élémentaire : $a = 42,6 \text{ \AA}$
- $b = 80,6 \text{ \AA}$
- $c = 137,0 \text{ \AA}$
- $\alpha = \beta = \gamma = 90,0^\circ$
- système cristallin orthorhombique

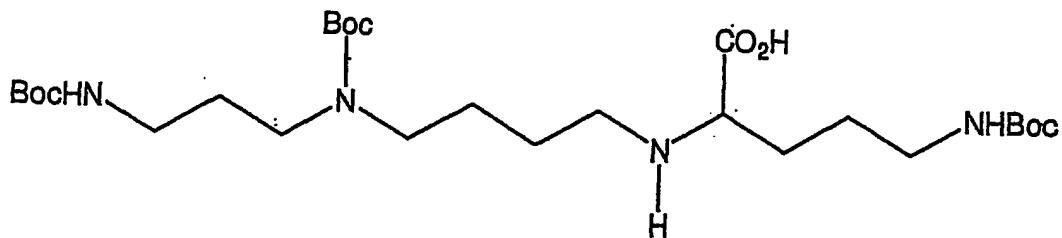
30

- groupe d'espace P₂₁2₁2₁
- nombre de molécules d'enzyme par maille cristalline de la maille élémentaire = 4

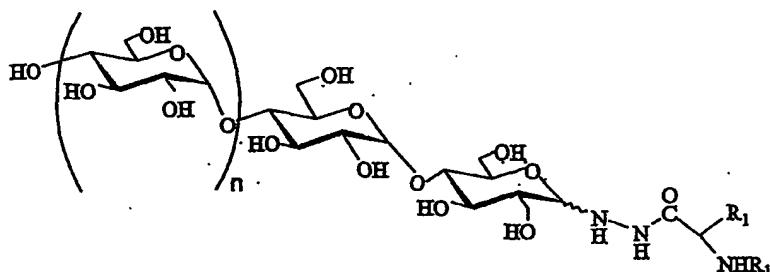
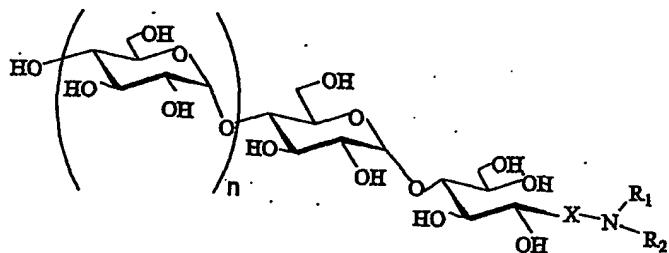
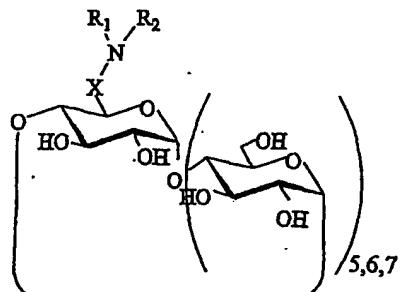
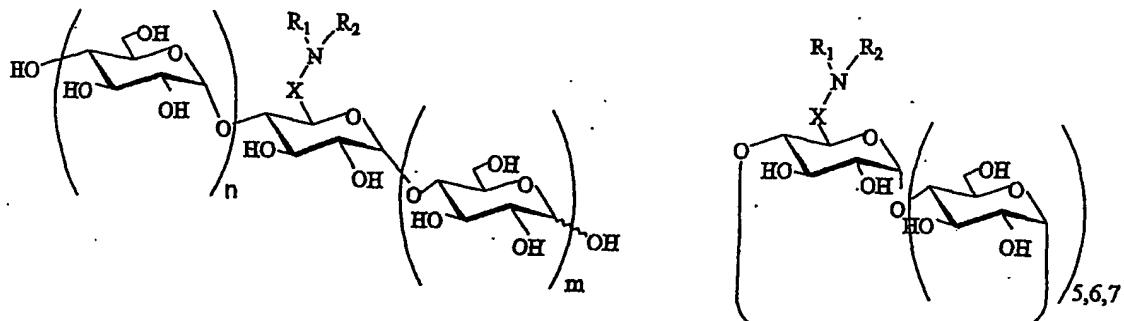
5 11. Polyamine susceptible d'entrer dans la constitution du complexe selon l'une quelconque des revendications 4 à 9, et notamment constituée par une chaîne d'environ 6 à environ 20 atomes, notamment comportant d'environ 6 à environ 15, et avantageusement d'environ 6 à environ 10 atomes d'azote, avantageusement deux fonctions amines primaires, respectivement à chacune des extrémités de la polyamine,
10 l'une au moins des fonctions amines étant éventuellement substituée par un substituant choisi parmi les polysaccharides linéaires ou cycliques possédant d'environ 1 à environ 6 unités osidiques avantageusement le glucose, le maltose, ou la cyclodextrine et l'un au moins des atomes d'azote à l'intérieur de la chaîne étant éventuellement substitué par un substituant choisi parmi les oligosaccharides linéaires ou cycliques de 1 à 6 unités,
15 notamment de 1 à 3 unités osidiques, notamment le glucose, le maltose ou la cyclodextrine sous réserve que la polyamine soit différente des produits suivants :

- la spermidine
- la spermine

20'



12. Dérivés de polyamine selon la revendication 11, répondant à l'une des formules générales suivantes :



$\text{X} = \text{CH}_2, \text{CO}$

$\text{R}_1 = \text{H}, (\text{CH}_2)_y[\text{NH}- (\text{CH}_2)_z]-\text{NHR}_4$

$\text{R}_2 = (\text{CH}_2)_y[\text{NH}- (\text{CH}_2)_z]-\text{NHR}_4$

$\text{R}_3 = \text{H, alkyl, aryl, alkenyl, } \omega\text{-carboxyalkyl}$

$\text{R}_4 = \text{H, alkyl, acyl}$

$y, z = 3, 4$

$l = 1, 2, 3$

$m, n = 0 - 8$

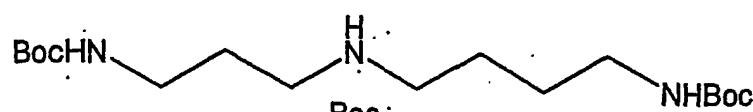
ou répondant, de manière avantageuse, à cette formule générale :



dans laquelle m et n sont compris entre 2 et 8, et dans laquelle le groupe R est soit H, soit un groupe glucose, soit un groupe maltooligosaccharide, soit un 5 groupement aryl comprenant avantageusement 6 atomes de carbone, soit un groupement alkyl comprenant avantageusement 6 atomes de carbone,

ou à l'une des formules suivantes :

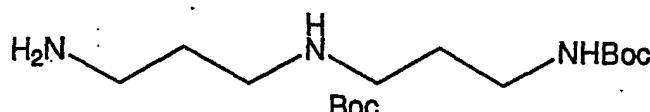
10



15



20



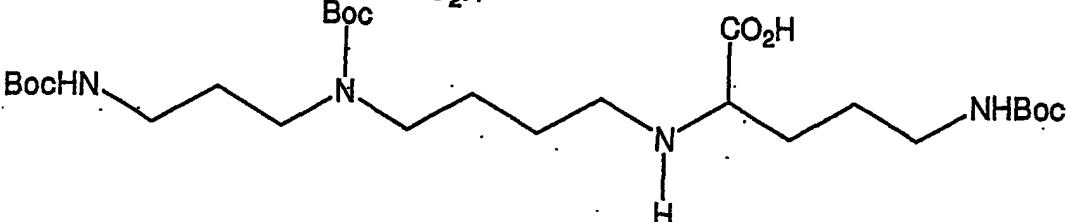
25

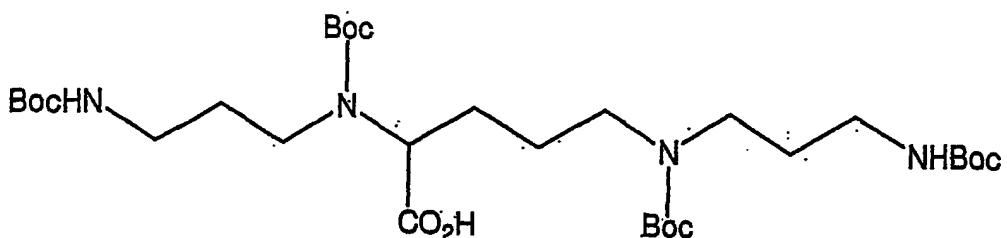


30



35





Bn = benzyle

Boc = butyloxycarbonyl,

la longueur des chaînes alkyle entre les atomes d'azote pouvant varier d'environ 3
à environ 5 atomes de carbone, les chaînes alkyle pouvant également être substituées par
10 des groupements chimiques comprenant préférentiellement une fonction aminée ou
dérivée, les chaînes alkyle pouvant également comporter des atomes d'azote autres que
ceux représentés sur les formules ci-dessus.

Numérotation des atomes de la spermidine :

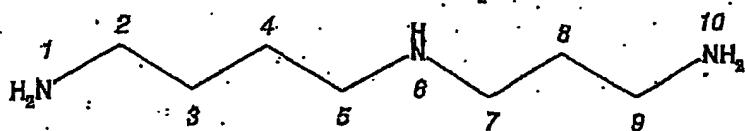


Schéma des interactions entre les résidus d'AMY1 et la molécule spermidine dans le complexe AMY1 / spermidine :

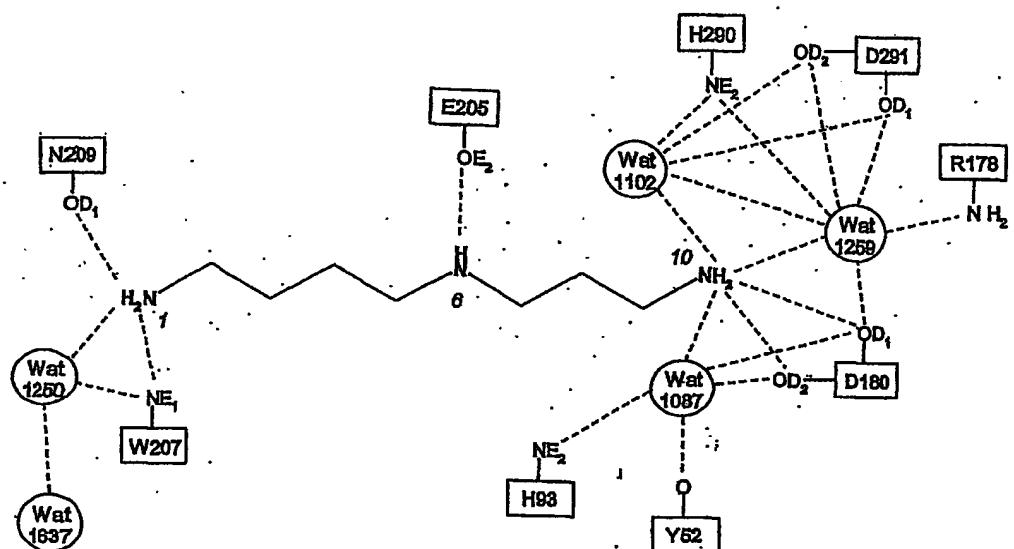


FIGURE 1

BEST AVAILABLE COPY

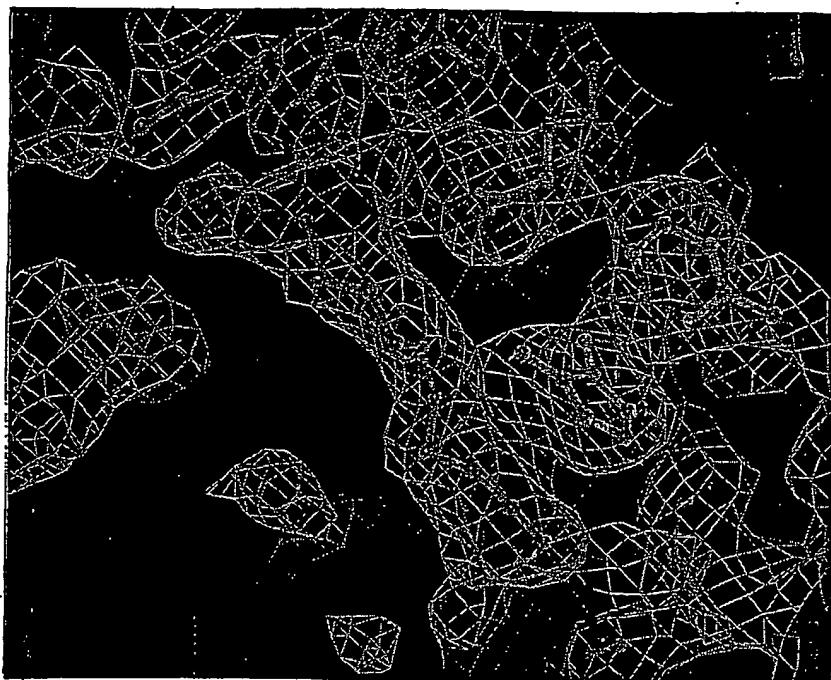


FIGURE 2

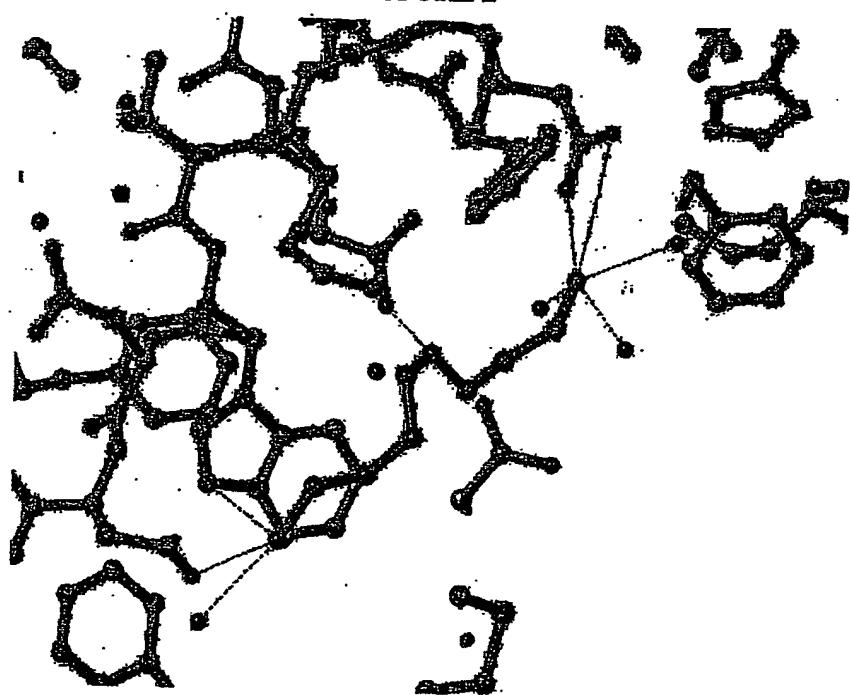


FIGURE 3

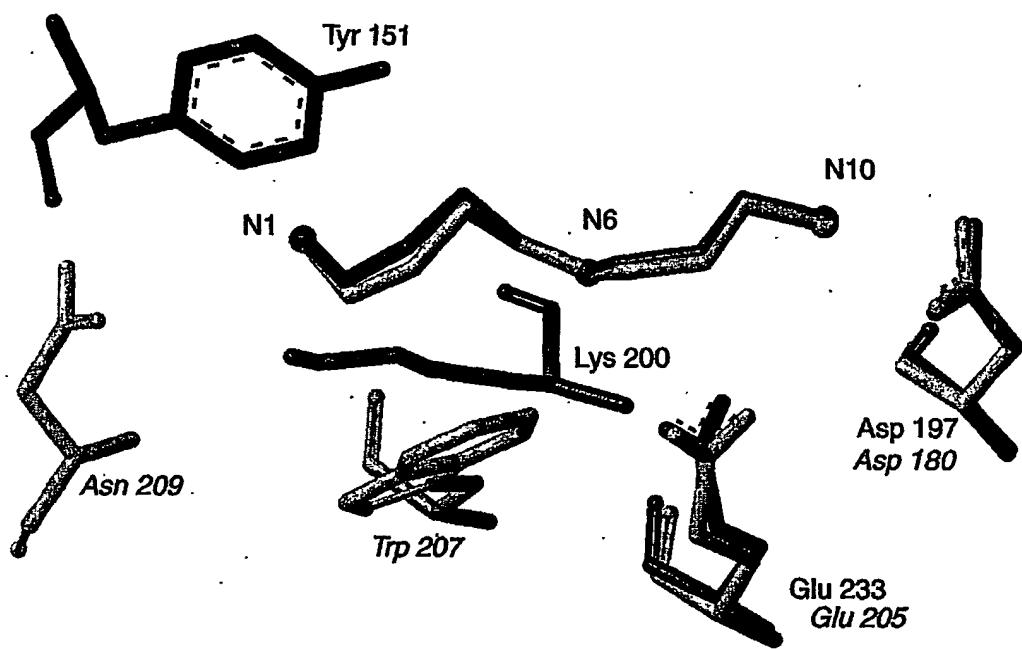


FIGURE 4

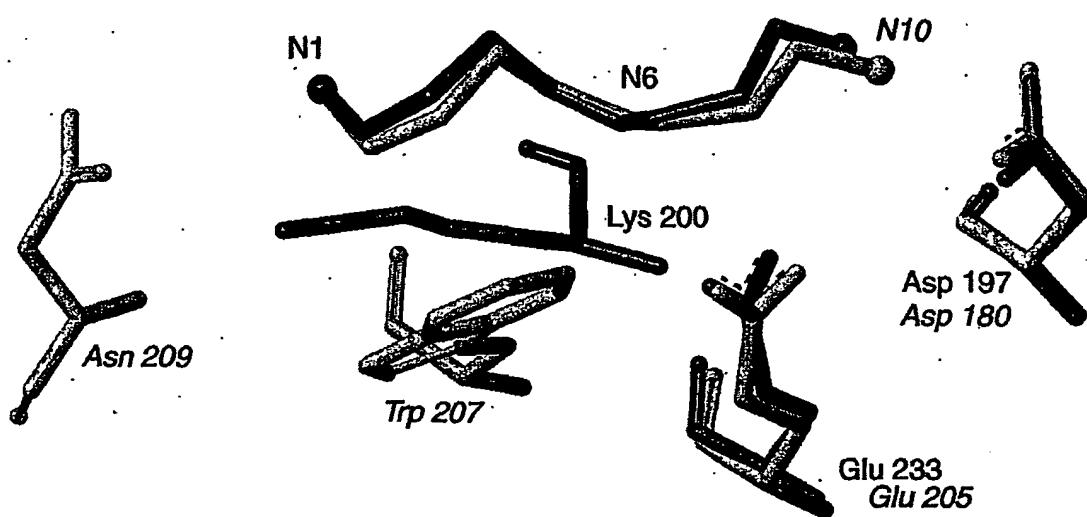


FIGURE 5

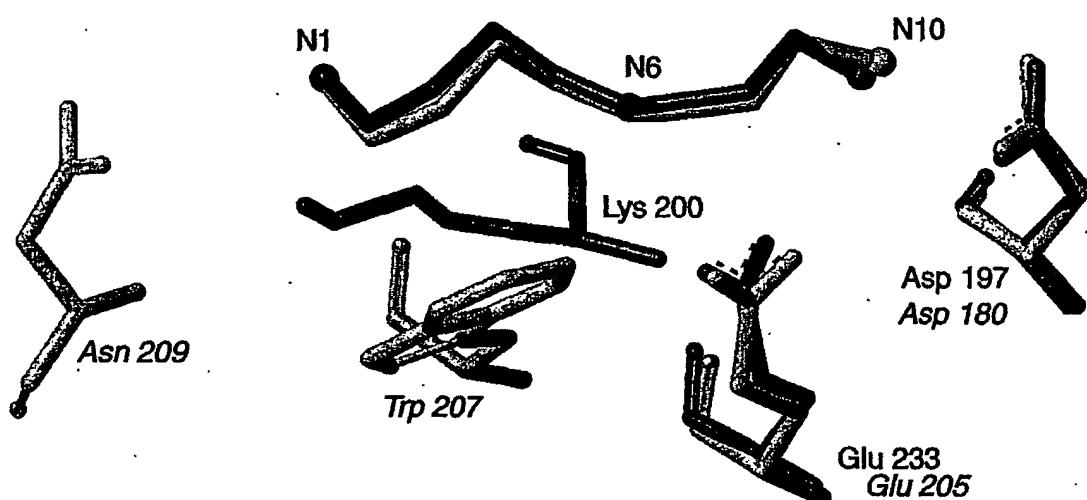
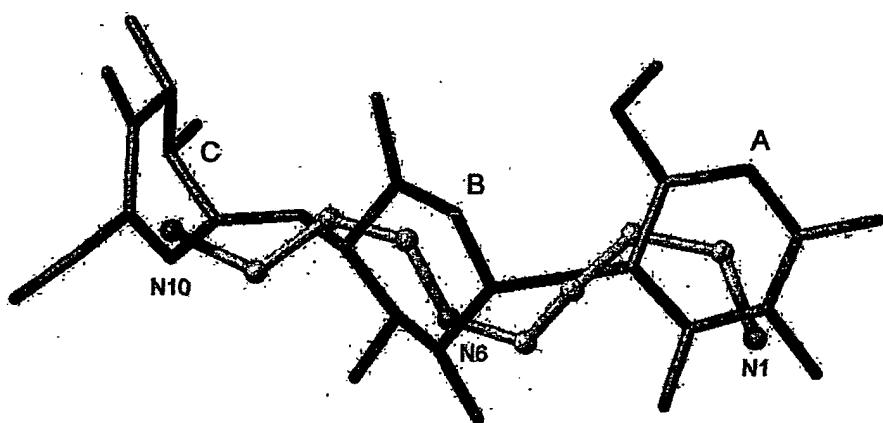
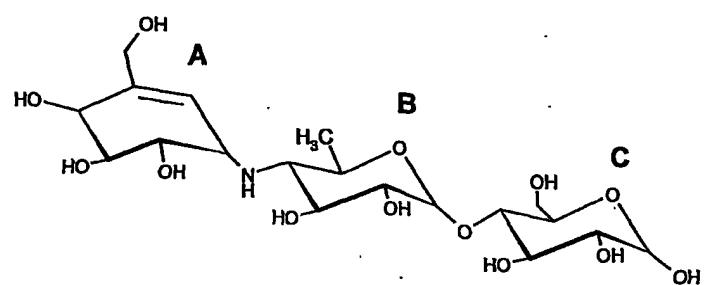


FIGURE 6

**FIGURE 7****FIGURE 8**